

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINA GRACIA POITEVIN

SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO  
DE ESPOROS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE  
*DUPONCHELIA FOVEALIS* ZELLER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

CURITIBA

2019

CAROLINA GRACIA POITEVIN

SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E MÉTODOS DE PRODUÇÃO  
DE ESPOROS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO CONTROLE BIOLÓGICO DE  
*DUPONCHELIA FOVEALIS* ZELLER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ida Chapaval Pimentel

CURITIBA  
2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Poitevin, Carolina Gracia

Seleção de fungos entomopatogênicos e métodos de produção de esporos e metabólitos secundários no controle biológico de *Duponchelia fovealis* ZELLER (Lepidoptera: Crambidae). / Carolina Gracia Poitevin. – Curitiba, 2019.

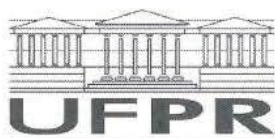
88 p.: il.

Orientadora: Ida Chapaval Pimentel

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Fungos entomopatogênicos 2. Mariposa 3. Morango – Doenças e pragas 4. Pragas - Controle biológico I. Título II. Pimentel, Ida Chapaval III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 632.96



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MICROBIOLOGIA,  
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA - 40001016044P0

## TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **CAROLINA GRACIA POITEVIN** intitulada: **Seleção de fungos entomopatogênicos e métodos de produção de esporos e metabólitos secundários no controle biológico de *Duponchelia fovealis* ZELLER (Lepidoptera: Crambidae)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


CURITIBA, 22 de Março de 2019.

  
IDA CHAPAVAL PIMENTEL

Presidente da Banca Examinadora

  
MARION DO ROCIO FOERSTER  
Avaliador Externo (UFPR)

  
SUSAN GRACE KARP  
Avaliador Externo (UFPR)

  
GABRIEL MOURA MASCARIN  
Avaliador Externo (EMBRAPA)

  
WESLEY MAURICIO DE SOUZA  
Avaliador Externo (UFPR)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À minha família, em especial meus pais, Rosangela e Raul, por estarem ao meu lado me amparando e me incentivando sempre.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ida Pimentel, por me dar uma oportunidade quando decidi voltar a pós-graduação. Sou muito grata por todos os ensinamentos, conselhos, parcerias e amizade que tivemos nos últimos anos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Aparecida Zawadneak, por toda a orientação e auxílio nesta área tão desconhecida para mim que é a entomologia.

Ao Prof<sup>o</sup> Miguel Nosedá, por toda a ajuda dada para a realização do último capítulo deste trabalho, e ao Diego, por ter feito as liofilizações.

À Dr<sup>a</sup> Maria Silvia Leite, pela doação dos bioinseticidas comerciais. À Bioagro, pela doação das mudas de morangueiro. À SL Alimentos e à Café Atributo, pela doação das cascas de café, soja e aveia.

Aos colegas do LabMicro e do Laboratório Costa Lima, pela colaboração, incentivo e parceria. Um agradecimento especial para quem trabalhou lado a lado comigo para a realização deste trabalho: Rafaela Amatuzzi, Mariana Porsani, Franciele Baja, Alex Poltronieri, Fernanda Ito.

Ao LIMQ e ao Laboratório de Biotecnologia de Carboidratos, por disponibilizar o espaço para a realização de experimentos.

Ao Departamento de Patologia Básica e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelo auxílio sempre que necessário.

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado, e ao CNPq, pelo financiamento deste projeto.

## RESUMO

A mariposa *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) é uma praga polífaga descoberta no Brasil no cultivo de morango no Paraná em 2010. Desde então tem se espalhado para outras regiões produtoras, e o controle muitas vezes é feito com defensivos não autorizados pelo Ministério da Agricultura e Pecuária. Além disso, o hábito críptico da lagarta diminui a eficiência dos inseticidas. Sendo assim, o controle biológico com fungos entomopatogênicos é uma alternativa a ser considerada no manejo integrado, uma vez que os fungos produzem diferentes compostos que afetam os insetos praga. O objetivo desta pesquisa foi selecionar fungos entomopatogênicos capazes de controlar *D. fovealis*, otimizar a produção de seus esporos, e avaliar os metabólitos por eles produzidos. Os fungos foram selecionados a partir da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense, e testados contra *D. fovealis* em bioensaios de patogenicidade em folhas de morangueiro. As duas melhores linhagens foram Isa340 e Bea111, com mortalidade de 84,7% e 83,1%, respectivamente. Sua produção de esporos foi otimizada em fermentação sólida e fermentação submersa, não havendo diferença estatística entre as duas metodologias quanto à mortalidade de *D. fovealis*, produção ou tamanho de esporos. As linhagens que causaram mortalidade superior a 45% tiveram seus metabólitos avaliados em bioensaios contra ovos e lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. As frações contendo macro ou micromoléculas apresentaram baixa mortalidade, porém causaram letargia nas lagartas. Sendo assim, os resultados desta pesquisa indicam linhagens com potencial no controle biológico de *D. fovealis* e com possibilidade de produção em larga escala tanto por fermentação sólida quanto líquida. Entretanto, para utilização dos metabólitos secundários, novos testes devem ser feitos para otimização do meio de cultura e avaliação dos efeitos subletais.

**Palavras-chave:** Fungos entomopatogênicos. Lagarta-da-coroa. Morangueiro. *Beauveria bassiana*. *Cordyceps javanica*.

## ABSTRACT

The moth *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) is a polyphagous pest discovered in Brazil in strawberry fields in Paraná in 2010. Since then, it has spread to other producing regions, and the control is usually achieved with non-authorized pesticides. Besides, the cryptic habit of the larvae reduces insecticides efficiency. Thus, biological control using entomopathogenic fungi is an alternative to be considered in integrated management, since fungi produce different metabolites that affect insects. The aim of this research was to select entomopathogenic fungi capable of controlling *D. fovealis*, optimize their spore production, and evaluate the metabolites produced. Fungal isolates were originally obtained from Microbiological Collection of Paraná Network, and they were tested against *D. fovealis* in pathogenicity bioassays using strawberry leaves. The best strains were Isa340 and Bea111, causing mortality of 84.7% and 83.1%, respectively. Spore production was optimized in solid state and submerged fermentation, and there was no statistical difference between them related to *D. fovealis* mortality, production and size of spores. The strains causing mortalities higher than 45% had their metabolites evaluated in bioassays with eggs and third instar larvae of *D. fovealis*. The fractions caused low mortalities, however it is possible that they are responsible for sublethal damages to insect physiology. Therefore, the results from this research indicate that these strains have potential in biological control against *D. fovealis*, and there is a possibility of large scale production using solid state or submerged fermentation. However, other studies are necessary to use secondary metabolites, optimizing culture medium and evaluating sublethal effects.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi. European pepper moth. Strawberry. *Beauveria bassiana*. *Cordyceps javanica*.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE <i>Duponchelia fovealis</i> ZELLER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) .....	19
FIGURA 2 – CICLO DE INFECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM INSETOS .....	22

### CAPÍTULO 2

FIGURA 1 – MORTALIDADE (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADAS COM SUSPENSÃO FÚNGICA DE CONCENTRAÇÃO $1,5 \times 10^9$ ESPOROS.mL <sup>-1</sup> , APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R. DE $60 \pm 10\%$ E FOTOFASE DE 12 HORAS .....	37
FIGURA 2 – EXTERIORIZAÇÃO DOS FUNGOS NAS LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> , APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R. DE $60 \pm 10\%$ E FOTOFASE DE 12 HORAS. (a) <i>Beauveria bassiana</i> (B2), (b) <i>Cordyceps javanica</i> (Isa340), (c) <i>Purpureocillium lilacinum</i> (PAE 69), (d) <i>Beauveria caledonica</i> (Bea110), (e) <i>Akantomyces</i> sp. (Ins), (f) <i>Metarhizium anisopliae</i> (315). .....	38

### CAPÍTULO 3

FIGURA 1 – INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO E GRANULOMETRIA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE <i>Cordyceps javanica</i> E <i>Beauveria bassiana</i> EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO A $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .....	53
FIGURA 2 – INFLUÊNCIA DA ALTURA DO LEITO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE <i>Cordyceps javanica</i> E <i>Beauveria bassiana</i> EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO A $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .....	53
FIGURA 3 – DIAGRAMA DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE (a) <i>Cordyceps javanica</i> E (b) <i>Beauveria bassiana</i> EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO .....	54



FIGURA 4 – INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO E VOLUME DE MEIO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS SUBMERSOS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE <i>Cordyceps javanica</i> E <i>Beauveria bassiana</i> EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO A $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .....	55
FIGURA 5 – DIAGRAMA DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE (a) <i>Cordyceps javanica</i> E (b) <i>Beauveria bassiana</i> EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO .....	55
FIGURA 6 – GRÁFICO DE CONTOURNO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>Beauveria bassiana</i> EM pH 6,0 APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO .....	56
FIGURA 7 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>Cordyceps javanica</i> E <i>Beauveria bassiana</i> POR (a) FES E (b) FSub, APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS .....	56
FIGURA 8 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS ESPOROS. (a) <i>Cordyceps javanica</i> PRODUZIDO POR FES, AUMENTO DE 30000X, (b) <i>Cordyceps javanica</i> PRODUZIDO POR FSub, AUMENTO DE 30000X, (c) <i>Beauveria bassiana</i> PRODUZIDO POR FES, AUMENTO DE 25000X, (d) <i>Beauveria bassiana</i> PRODUZIDO POR FSub, AUMENTO DE 25000X.....	58

#### CAPÍTULO 4

FIGURA 1 – MORTALIDADE (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> PULVERIZADAS COM FRAÇÕES DE FERMENTADOS FÚNGICOS DE CONCENTRAÇÃO 15 mg DE LIOFILIZADO.mL <sup>-1</sup> , APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , U.R. DE $60 \pm 10\%$ E FOTOFASE DE 12 HORAS .....	71
FIGURA 2 – VIABILIDADE DE OVOS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE <i>Duponchelia fovealis</i> Mergulhados em frações de fermentados fúngicos de concentração 15 mg de liofilizado.mL <sup>-1</sup> , após 7 dias de incubação a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , U.R. de $60 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas... ..	72
FIGURA 3 – ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES RETIDAS (R) DO MEIO ADAMEK E DAS LINHAGENS 315 E B2.....	72
FIGURA 4 – ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES ELUÍDAS (E) DO MEIO ADAMEK E DAS LINHAGENS Bea1 E Bea111 .....	73

FIGURA 5 – ESPECTROS DE RMN- <sup>13</sup> C DA REGIÃO CARACTERÍSTICA DE CARBOIDRATOS DAS FRAÇÕES ELUÍDAS (E) DO MEIO ADAMEK E DAS LINHAGENS Bea1 E Bea111 .....	73
--	----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 – FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS AVALIADOS QUANTO AO POTENCIAL DE MORTALIDADE CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO INSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> .....	33
TABELA 2 – ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL <sub>50</sub> ) POR ANÁLISE DE PROBIT DO TESTE DE VIRULÊNCIA COM FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS E BIOINSETICIDAS CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO INSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2°C, U.R. DE 60 ± 10% E FOTOFASE DE 12 HORAS.....	39
TABELA 3 – ESTIMATIVA DO TEMPO LETAL MÉDIO (TL <sub>50</sub> ) NA CONCENTRAÇÃO DE 1,5 × 10 <sup>7</sup> ESPOROS.mL <sup>-1</sup> POR ANÁLISE DE PROBIT DO TESTE DE VIRULÊNCIA COM FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS E BIOINSETICIDAS CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO INSTAR DE <i>Duponchelia fovealis</i> .....	39

### CAPÍTULO 3

TABELA 1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TEMPERATURA, pH E UMIDADE INICIAL PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS POR FES .....	48
TABELA 2 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TEMPERATURA, pH E AGITAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS ENTOMOPATOGENICOS POR FSub.....	49
TABELA 3 – GRANULOMETRIA, QUANTIDADE DE ÁGUA ABSORVIDA (%) E pH DOS SUBSTRATOS TESTADOS .....	52
TABELA 4 – RENDIMENTO, GERMINAÇÃO, TAMANHO E MORTALIDADE DE <i>D. fovealis</i> (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) PARA ESPOROS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, FERMENTAÇÃO SUBMERSA E CULTIVO SEMI-SÓLIDO APÓS INCUBAÇÃO POR 12 DIAS NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS .....	57

## CAPÍTULO 4

TABELA 1 – RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO (EM mg DE LIOFILIZADO POR mL DE FERMENTADO) APÓS CULTIVO EM MEIO ADAMEK POR 7 DIAS A 27°C E AGITAÇÃO DE 110 rpm ..... 69

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E AÇÚCARES TOTAIS NAS FRAÇÕES RETIDAS E ELUÍDAS APÓS DIÁLISE EM MEMBRANA DE 6 – 8 kDa ..... 70

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. REVISÃO DA TESE .....	15
1 INTRODUÇÃO .....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral .....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Cultura do morangueiro.....	17
3.2 <i>Duponchelia fovealis</i> .....	18
3.3 Controle biológico.....	20
3.4 Produção de biomassa por processo fermentativo .....	22
3.5 Fatores de virulência produzidos por fungos entomopatogênicos.....	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
CAPÍTULO 2. SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Duponchelia fovealis</i> .....	31
RESUMO .....	31
1 INTRODUÇÃO .....	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
2.1 Preparo de inóculo .....	32
2.2 Criação de <i>D. fovealis</i> .....	35
2.3 Seleção de fungos (adaptado de QUESADA-MORAGA <i>et al.</i> , 2006) .....	35
2.4 Estimativa da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) e tempo letal médio (TL <sub>50</sub> ) .	35
3 RESULTADOS.....	36
3.1 Seleção de fungos entomopatogênicos.....	36
3.2 Estimativa da concentração letal média (CL <sub>50</sub> ) e tempo letal médio (TL <sub>50</sub> ) .	38
4 DISCUSSÃO .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
CAPÍTULO 3. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA PRODUÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE <i>Duponchelia fovealis</i> .....	44
RESUMO .....	44
1 INTRODUÇÃO .....	44

2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
2.1 Criação de <i>D. fovealis</i> (ZAWADNEAK <i>et al.</i> , 2017).....	46
2.2 Produção do inóculo em cultivo semi-sólido (CSS).....	46
2.3 Otimização das variáveis físico-químicas para FES.....	46
2.3.1 Seleção do substrato e influência da granulometria.....	46
2.3.2 Influência da altura do leito .....	47
2.3.3 Influência da temperatura, pH e umidade .....	47
2.4 Otimização das variáveis físico-químicas para FSub .....	48
2.4.1 Seleção do substrato e influência do volume de meio .....	48
2.4.2 Influência da temperatura, pH e agitação.....	49
2.5 Cinética da produção de esporos .....	49
2.6 Comparação entre os esporos produzidos por CSS, FES e FSub .....	49
2.6.1 Germinação .....	50
2.6.2 Viabilidade e estabilidade em armazenamento a frio .....	50
2.6.3 Tamanho.....	50
2.6.4 Bioensaio com <i>D. fovealis</i> (POITEVIN <i>et al.</i> , 2018).....	51
3 RESULTADOS.....	52
3.1 Otimização das variáveis físico-químicas para FES.....	52
3.1.1 Seleção do substrato e influência da granulometria.....	52
3.1.2 Influência da altura do leito .....	53
3.1.3 Influência da temperatura, pH e umidade .....	54
3.2 Otimização das variáveis físico-químicas para FSub .....	54
3.2.1 Seleção do substrato e influência do volume de meio .....	54
3.2.2. Influência da temperatura, pH e agitação.....	55
3.3 Cinética da produção de esporos .....	56
3.4 Comparação entre os esporos produzidos por CSS, FES e FSub .....	57
4 DISCUSSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
CAPÍTULO 4. ATIVIDADE INSETICIDA DO FERMENTADO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA <i>Duponchelia fovealis</i> .....	64
RESUMO .....	64
1 INTRODUÇÃO.....	64
2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	66
2.1 Fungos .....	66
2.2 Produção do fermentado (adaptado de QUESADA-MORAGA; CARRASCO- DÍAZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006) e fracionamento em macro e micromoléculas .....	66

2.3 Dosagem de proteína total (adaptado de BRADFORD, 1976) .....	66
2.4 Dosagem de açúcares totais (adaptado de DUBOIS <i>et al.</i> , 1956) .....	67
2.5 Criação de <i>D. fovealis</i> .....	67
2.6 Avaliação da atividade inseticida das frações contendo micromoléculas (E) e macromoléculas (R) (adaptado de POITEVIN <i>et al.</i> , 2018).....	67
2.7 Avaliação da atividade ovicida das frações (E) e (R) .....	68
2.8 Análise estatística.....	68
2.9 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	68
3 RESULTADOS.....	69
3.1 Produção do fermentado .....	69
3.2 Avaliação da atividade inseticida das frações (E) e (R).....	70
3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN) .....	72
4 DISCUSSÃO .....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
CONCLUSÃO .....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	80



## CAPÍTULO 1. REVISÃO DA TESE

### 1 INTRODUÇÃO

O morangueiro é uma cultura de pequeno porte de grande relevância socioeconômica em todo o mundo, sendo o Brasil um importante produtor da fruta (FACHINELLO *et al.*, 2011). O Paraná destaca-se por apresentar a segunda maior produção no país, aproximadamente 18 mil toneladas (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016). Um dos maiores problemas na cultura do morango é a incidência de doenças e pragas, que requer a constante utilização de defensivos agrícolas para impedir ou minimizar os efeitos dos patógenos e insetos-praga (OSHITA; JARDIM, 2012).

Entre os insetos que atacam o morangueiro, destaca-se a mariposa *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), nativa da região Mediterrânea e Ilhas Canárias (CABI, 2019). No Brasil, é considerada praga exótica, sendo que a lagarta se alimenta de todas as partes da planta, causando danos em folhas, flores e frutos, e podendo levar a planta à morte (ZAWADNEAK *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos, estima-se que os danos ocasionados por esta praga levem a prejuízos acima de 300 milhões de dólares anuais à produção de morango (STOCKS; HODGES, 2012).

O potencial de dano dessa praga é alto devido à presença de lagartas ao longo de todo o ciclo da cultura (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016), e seu controle é dificultado devido ao comportamento das lagartas de permanecerem na parte basal da planta (BRAMBILA; STOCKS, 2010; ZAWADNEAK *et al.*, 2016). A necessidade de reduzir a população de *D. fovealis* leva ao uso indiscriminado de inseticidas para seu controle. Isso gera problemas principalmente devido à sua ação poluidora, aos resíduos deixados nos alimentos, à resistência de determinados insetos ao produto químico e à ação deste produto não apenas contra insetos prejudiciais, mas também contra insetos benéficos e o ser humano (VAN LENTEREN, 2012). Além disso, no Brasil ainda não existe registro de inseticidas que podem ser utilizados no controle de *D. fovealis* (MAPA, 2019).

Com a necessidade de reduzir o uso de inseticidas químicos tem-se procurado desenvolver metodologias eficientes no controle de pragas. Assim, o

controle biológico com inimigos naturais, principalmente por meio de microrganismos, surge como alternativa viável no manejo integrado de pragas (AMATUZZI *et al.*, 2018a; AMATUZZI *et al.*, 2018b; POITEVIN *et al.*, 2018). O potencial de utilização de fungos entomopatogênicos no controle de insetos pode ser mais efetivo se estes fungos puderem ser inoculados artificialmente nas plantas, uma vez que já são agentes de controle biológico natural de inúmeras pragas (HAJEK; DELALIBERA JR, 2010).

A etapa de seleção de isolados fúngicos capazes de regular o crescimento de pragas é crucial para o desenvolvimento de estratégias de biocontrole. Além da virulência, um bom agente de controle também deve apresentar características que permitam a produção em larga escala, como baixo custo e alto rendimento (MASCARIN *et al.*, 2013; ROBL *et al.*, 2009). As características nutricionais do meio e as variáveis físicas relacionadas ao crescimento de microrganismos têm impacto significativo na produtividade e eficácia dos esporos. Portanto, a otimização das variáveis químicas e físicas é importante para o desenvolvimento de um bioprocesso comercialmente viável (KUMAR *et al.*, 2011; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

Sendo assim, o presente projeto objetivou selecionar fungos entomopatogênicos capazes de controlar a praga *D. fovealis* a partir da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (TaxOnline) da Universidade Federal do Paraná. Fermentados das linhagens com melhores resultados foram avaliados quanto à sua atividade inseticida. Além disso, os fungos com maior potencial no controle de *D. fovealis* passaram por um processo de otimização da produção de biomassa por processo fermentativo, o que permitirá o desenvolvimento de novos bioinseticidas.

Para organizar os diferentes tópicos abordados, esta tese está apresentada em quatro capítulos, sendo que o capítulo 1 contempla uma revisão da literatura; o capítulo 2 apresenta a etapa de seleção de fungos entomopatogênicos para o controle biológico de *D. fovealis*; no capítulo 3 estão as etapas de otimização da produção de esporos; e no capítulo 4 está a avaliação da atividade inseticida dos fungos contra *D. fovealis*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivos desenvolver um bioprocesso para produção de biomassa de fungos entomopatogênicos com potencial no controle biológico de *Duponchelia fovealis*, e a avaliar seus metabólitos.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Selecionar linhagens de fungos entomopatogênicos mais eficientes no controle de *D. fovealis*;
- b) Otimizar as variáveis físico-químicas para produção de biomassa fúngica por fermentação em estado sólido (FES);
- c) Otimizar as variáveis físico-químicas para produção de biomassa fúngica por fermentação submersa (FSub);
- d) Realizar estudo de cinética de produção de biomassa;
- e) Comparar FSub e FES quanto à produção, tamanho e germinação dos esporos, e quanto à mortalidade de lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*;
- f) Avaliar a atividade inseticida e ovicida das frações obtidas a partir do caldo fermentado pelos fungos selecionados anteriormente.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Cultura do morangueiro

O morangueiro, *Fragaria x ananassa* Duchesne, pertence à família Rosaceae e é um híbrido resultante do cruzamento entre as espécies *F. chiloensis* e *F. virginiana* (MARTINS *et al.*, 2009). É uma das frutas de pequeno porte com maior expressão econômica e consumido em diversos países (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016). Em 2017, a produção mundial de morangos foi de 9,2 milhões de toneladas em uma área cultivável de 395,8 mil hectares (FAO, 2019). No Brasil, é cultivado principalmente em Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul,

São Paulo, Espírito Santo e Goiás. O Paraná tem produtividade de 30 toneladas por hectare, sendo o segundo maior produtor (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016).

O cultivo do morangueiro pode ser feito em três sistemas, convencional, orgânico ou hidropônico, podendo ser tanto a céu aberto quanto em túneis protegidos. O sistema de cultivo fora do solo em substrato, também chamado de semi-hidropônico, está em expansão nas áreas de cultivo de morangueiros no Brasil. Tem como vantagens ser uma tecnologia limpa, não precisar de rotação de culturas, permitir o controle de água e nutrientes, e produzir frutos com menos resíduo de defensivos químicos, pois dispensa a desinfecção do solo e reduz o uso de agrotóxicos (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016).

A incidência de doenças e pragas é um dos principais problemas na cultura do morango, e requer a utilização de agrotóxicos para impedir ou minimizar os efeitos dos danos (OSHITA; JARDIM, 2012). O uso sistemático de defensivos químicos faz do morango o segundo produto agrícola com maior residual de pesticidas (ANVISA, 2016).

### **3.2 *Duponchelia fovealis***

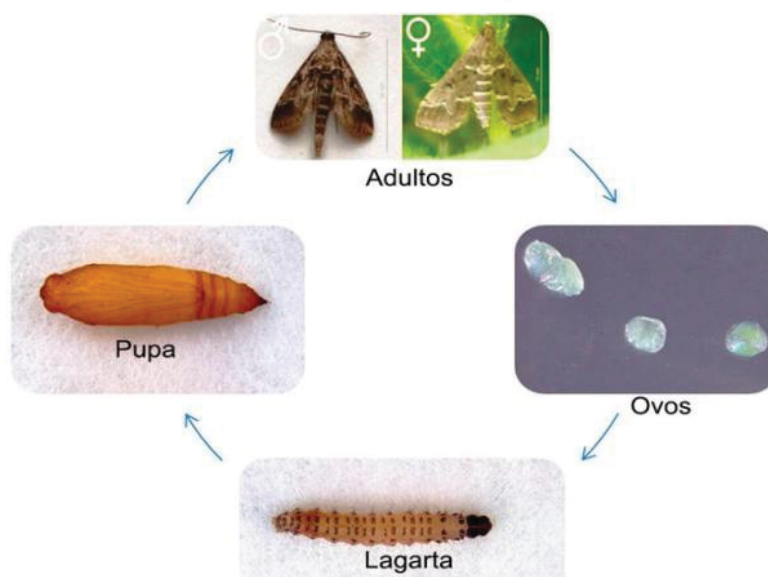
A mariposa *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como lagarta-da-coroa, é nativa da região Mediterrânea e Ilhas Canárias (CABI, 2019), mas já se dispersou para outros países. Está estabelecida na Europa, África, Oriente Médio, nordeste da Índia, Canadá e Estados Unidos (STOCKS; HODGES, 2012). No Brasil, a lagarta-da-coroa é uma praga exótica, primeiramente identificada em folhas, flores e frutos do morangueiro. A mariposa foi detectada em 2008 pela equipe do Grupo Técnico da Produção Integrada do Morangueiro (PIMo), no município de São José dos Pinhais, e identificada em 2010 (ZAWADNEAK *et al.*, 2016).

A lagarta é uma praga polífaga, podendo atacar plantações e plantas ornamentais. Alguns hospedeiros conhecidos são pimenta (*Capsicum annuum*), beterraba (*Beta vulgaris*), manjerição (*Ocimum basilicum*), amora (*Rubus fruticosus*), tomate (*Solanum lycopersicum*), milho (*Zea mays*), morango (*Fragaria x ananassa*) azaleia (*Rhododendron* spp.), begônia (*Begonia* spp.) e orquídea (*Phalaenopsis* spp.) (BRAMBILA; STOCKS, 2010; CABI, 2019; STOCKS; HODGES, 2012).

No morangueiro, a lagarta se alimenta de folhas, brotos, inflorescências, raízes e caules. As plantas danificadas apresentam folhas com furos, e flores e frutos também podem ficar danificados. Quando há infestação severa, as plantas ficam enfraquecidas, portanto a produtividade diminui drasticamente, podendo levar à morte precoce da planta (ZAWADNEAK *et al.*, 2016). O potencial de dano dessa praga é alto devido à presença de lagartas ao longo de todo o ciclo da cultura (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016), e ao hábito críptico das mesmas (BRAMBILA; STOCKS, 2010; ZAWADNEAK *et al.*, 2016).

Cada fêmea deposita em torno de 200 ovos, e o período de ovo a adulto ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas) em dieta artificial é de 38 dias (ZAWADNEAK *et al.*, 2017). Os ovos medem de 0,3 a 0,6 mm, e inicialmente têm coloração creme, tornando-se avermelhados perto da eclosão (FIGURA 1). São depositados isoladamente, ou em grupos de 3 a 10 unidades (ZAWADNEAK *et al.*, 2016).

FIGURA 1 – CICLO DE VIDA DE *Duponchelia fovealis* ZELLER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)



Fonte: AMATUZZI (2018)

As lagartas apresentam cinco ínstar, ou estádios larvais, e têm coloração branco-creme a marrom-clara, com comprimento de 20 mm no último ínstar. A cabeça tem cor marrom-escura, e possui manchas mais escuras ao longo do corpo (ZAWADNEAK *et al.*, 2016). A pupa tem 9-12 mm, e seu casulo é composto por teia,

fragmentos vegetais, solo e excrementos. Tem coloração amarela, se tornando mais escura próximo da emergência (STOCKS; HODGES, 2012).

Os adultos têm envergadura de 19-21 mm e comprimento de 9-12 mm. As asas têm coloração marrom, sendo mais claras nas pontas, e apresentam duas finas linhas transversais amarelas. Os machos têm abdome mais afilado e com uma curva na parte inferior, enquanto as fêmeas são menores e mais robustas (STOCKS; HODGES, 2012; ZAWADNEAK *et al.*, 2016).

### **3.3 Controle biológico**

Devido à demanda internacional pela redução do uso de defensivos químicos na agricultura, a utilização do manejo integrado de pragas (MIP) vem crescendo, especialmente na última década (STENBERG, 2017; VAN LENTEREN *et al.*, 2017). O MIP é uma estratégia que objetiva controlar pestes, sejam doenças ou insetos-praga, usando todo o arsenal de metodologias disponíveis, de modo a reduzir a aplicação de defensivos (STENBERG, 2017). Algumas das técnicas de controle disponíveis são cultural, mecânico, comportamental, químico e biológico (PARRA *et al.*, 2002).

O controle biológico consiste na utilização de inimigos naturais no controle da população de pragas, seja diminuindo sua densidade populacional ou sua capacidade de causar danos. Pode ser natural ou aplicado, sendo o segundo comumente dividido em três estratégias: controle biológico conservativo, clássico e inundativo. O controle conservativo envolve a modificação do ambiente de forma a proteger e aumentar a população dos agentes de controle naturalmente presentes, reduzindo o efeito das pragas. As demais estratégias consistem na liberação intencional de um agente de controle. No controle clássico, há o intuito de estabelecimento em longo prazo, enquanto no controle inundativo espera-se que o agente se multiplique e sobreviva apenas por determinado período de tempo (EILENBERG *et al.*, 2001; VAN LENTEREN, 2012).

Esta técnica de controle é frequentemente utilizada quando espécies exóticas se estabelecem em novas áreas e atingem alta densidade populacional. Acredita-se que o aumento da população esteja relacionado à ausência do seu inimigo natural, e a introdução de agentes de controle externos pode regular o desenvolvimento da praga (HAJEK; DELALIBERA JR, 2010).

O biocontrole apresenta vantagens ambientais e econômicas em relação ao uso de inseticidas e fungicidas químicos. A taxa de sucesso no controle biológico é de 1:10, enquanto no controle químico é 1:140.000. Além disso, a utilização de agentes biológicos oferece alta especificidade quanto ao alvo, sem interferir no desenvolvimento de insetos benéficos. Não há efeitos colaterais, e seu custo de desenvolvimento é 1% do custo de controles químicos (VAN LENTEREN, 2012).

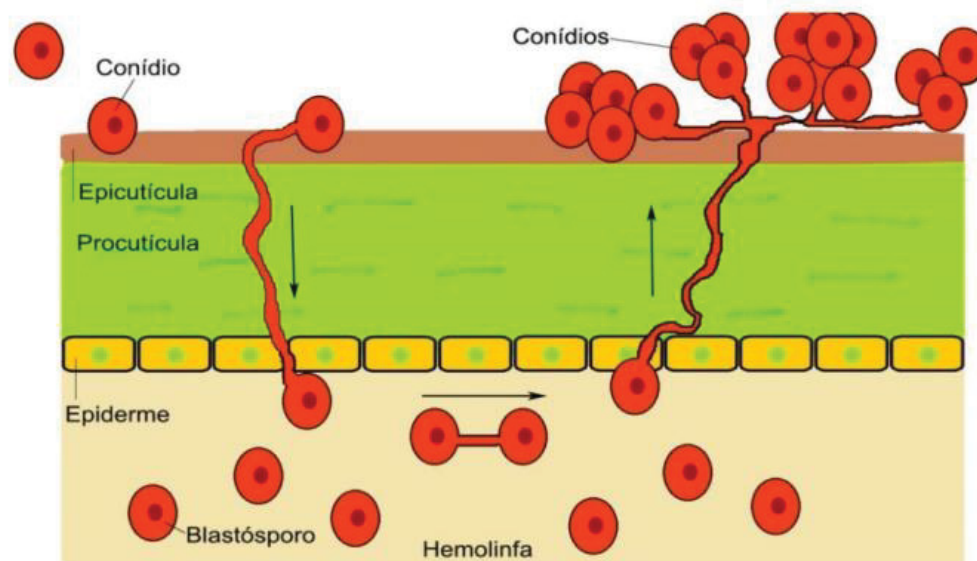
O manejo de insetos pode ser feito com predadores, parasitoides ou patógenos (ALVES, 1998; PARRA *et al.*, 2002). Nos últimos anos, estudos visando o controle biológico de *D. fovealis* vêm sendo feitos utilizando fungos (AMATUZZI *et al.*, 2018a; AMATUZZI *et al.*, 2018b; POITEVIN *et al.*, 2018) e parasitoides (PAES *et al.*, 2018; PIROVANI *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2017). Os fungos entomopatogênicos são capazes de infectar e causar doenças em insetos e outros artrópodes, e estão comumente relacionados ao controle natural de muitas pragas (PELL; HANNAM; STEINKRAUS, 2010). Essa característica faz dos fungos entomopatogênicos ideais para o uso como agente de controle biológico (HAJEK; DELALIBERA JR, 2010).

O fungo infecta o hospedeiro por penetração direta da cutícula ou orifícios naturais. O microrganismo adere à cutícula e germina, produzindo um tubo germinativo que permite a penetração no hospedeiro graças à pressão física e à produção de enzimas extracelulares (FIGURA 2). Uma vez que o fungo penetra o hospedeiro, passa a colonizar a hemocela, causando a depleção de nutrientes, invasão de tecidos e órgãos, asfixia devido às toxinas secretadas e, finalmente, a morte do inseto. Então, o fungo esporula e emerge, podendo infectar novos insetos (MOONJELY; BARELLI; BIDOCHKA, 2016; QUESADA-MORAGA; HERRERO; ZABALGOGEAZCOA, 2014).

Biopesticidas à base de fungos entomopatogênicos como *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria*, já estão disponíveis comercialmente, mas não há registro destes para uso na cultura do morangueiro (GONZALEZ *et al.*, 2016; MAPA, 2019; MASCARIN *et al.*, 2018; VEGA *et al.*, 2009).



FIGURA 2 – CICLO DE INFECÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS EM INSETOS



Fonte: AMATUZZI (2018)

### 3.4 Produção de biomassa por processo fermentativo

O sucesso de um biopesticida comercial depende em grande parte da sua metodologia de produção e sua formulação. A produção de biomassa em larga escala pode ser feita basicamente por três processos fermentativos: a fermentação líquida ou submersa (FSub), a fermentação em estado sólido (FES) (MASCARIN *et al.*, 2015) ou a fermentação bifásica (MASCARIN *et al.*, 2018). Enquanto a fermentação submersa acontece em meio líquido agitado, a fermentação em estado sólido é caracterizada pela baixa quantidade de água livre. A matriz sólida é responsável por ser o suporte para o desenvolvimento da reação e fornecer os nutrientes necessários (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Já a fermentação bifásica consiste em um processo em duas etapas, com uma FSub para produção inicial de micélio ou esporos, que são então inoculados em um substrato sólido (MASCARIN *et al.*, 2018).

A FES é a metodologia comumente empregada para o crescimento de agentes de controle biológico, como *Beauveria*, *Isaria* (= *Cordyceps*) (SILVA *et al.*, 2018), *Lecanicillium* (= *Akanthomyces*) (MASCARIN *et al.*, 2013), *Clonostachys* (VICCINI *et al.*, 2007), *Metarhizium* (PRAKASH *et al.*, 2008) e *Paecilomyces* (= *Purpureocillium*) (ROBL *et al.*, 2009). Como o substrato simula as condições naturais para o crescimento fúngico, a FES apresenta esporos com melhores propriedades, como eficácia e estabilidade (JACKSON, 1997; VICCINI *et al.*, 2007). Porém,

desvantagens como tempo alto de fermentação, alto risco de contaminação, dificuldade de recuperação do produto e dificuldade no escalonamento do processo tornam a FSub uma alternativa a ser considerada na produção de bioinseticidas, como na produção de *Beauveria*, *Cordyceps* e *Metarhizium* (JACKSON, 1997; MASCARIN *et al.*, 2014; MASCARIN *et al.*, 2015).

A escolha da metodologia a ser empregada deve levar em consideração o custo do processo, a produtividade e a qualidade dos esporos (ROBL *et al.*, 2009). Mas independente da técnica, uma etapa crucial é a otimização das condições químicas e físicas da reação. O meio ideal deve ter baixo custo, e permitir o crescimento de micélio, e consequente esporulação com alto rendimento (KUMAR *et al.*, 2011).

A primeira etapa para otimizar um bioprocessos é a escolha de um meio de cultura semi-definido que permita alterações em sua formulação de acordo com as necessidades nutricionais do microrganismo e rendimento da reação (JACKSON, 1997), para então avaliar os fatores físicos. Alterações nas condições de cultivo podem produzir esporos morfologicamente e bioquimicamente diferentes (HEGEDUS *et al.*, 1992), o que pode influenciar no rendimento, estabilidade e infectividade dos mesmos. Entre os fatores nutricionais, pode-se citar a fonte de carbono, fonte de nitrogênio, razão carbono/nitrogênio, metais traços e vitaminas; entre as variáveis físicas estão a temperatura, pH, umidade, aeração e tamanho de partículas (JACKSON, 1997; RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2007).

O Brasil é um país agrícola, e os resíduos agroindustriais são produzidos em grande quantidade, mas possuem baixo valor agregado. Entretanto, muitos desses resíduos apresentam alto valor nutricional e podem ser utilizados como substrato para a produção de biomassa fúngica. Dentre eles, pode-se citar melaço de cana, bagaço de cana, bagaço de mandioca, casca de café, casca de soja e casca de arroz (ROBL *et al.*, 2009; SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

### **3.5 Fatores de virulência produzidos por fungos entomopatogênicos**

Fungos são capazes de produzir uma imensa gama de metabólitos secundários, como proteínas, enzimas, ácidos orgânicos e corantes (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Para conseguir infectar um inseto, o fungo deve ser capaz de produzir enzimas extracelulares para penetrar a cutícula e colonizar os

tecidos, e toxinas que irão causar a debilidade e posterior morte do inseto (GIBSON *et al.*, 2014).

Proteases, quitinases e lipases são as principais enzimas que auxiliam na degradação da cutícula e permitem a penetração do fungo. Existem cerca de 14 isoformas de proteases produzidas por fungos entomopatogênicos, sendo a subtilisina (Pr1) e a tripsina (Pr2) as proteases extracelulares mais comuns (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Em particular, a Pr1 é considerada um marcador de entomopatogenicidade (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI; QUESADA-MORAGA, 2013), produzida no apressório como resposta à falta de nutrientes (WANG; LOVETT; ST. LEGER, 2019).

Entre as toxinas estão ácidos orgânicos, como o ácido oxálico e ácido dipicolínico (WENG *et al.*, 2019); policetídeos, por exemplo, oosporeína e tenelina (MC NAMARA *et al.*, 2019); e peptídeos não-sintetizados no ribossomo, como beauvericina, bassianolida e destruxina (GIBSON *et al.*, 2014; ZIMMERMANN, 2007a; ZIMMERMANN, 2007b). Entretanto, todas estas moléculas são metabólitos secundários de baixo peso molecular (CITO *et al.*, 2016), e pouco se conhece sobre as toxinas de maior peso molecular (QUESADA-MORAGA; CARRASCO-DÍAZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006).

No gênero *Metarhizium*, as destruxinas são as toxinas inseticidas mais conhecidas (ZIMMERMANN, 2007b). Descobertas em 1961, são produzidas principalmente por *M. anisopliae*, e os 38 tipos identificados foram classificados em cinco grupos, sendo todos constituídos por hexadepsipeptídeos cíclicos (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010). Depsipeptídeo é um peptídeo cujo radical amida foi substituído pelo éster correspondente. As destruxinas causam a abertura dos canais de cálcio da membrana celular do inseto, levando à despolarização da mesma, o que provoca paralisia dos músculos (PEDRAS; ZAHARIA; WARD, 2002) e danos nos túbulos de Malpighi (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010), afetando a mobilidade e excreção. Outras toxinas produzidas por *Metarhizium* são as citocalasinas e swainsoninas. As citocalasinas se ligam aos filamentos de actina, impedindo sua polimerização e consequentemente interferindo em vários processos celulares. Já as swainsoninas são inibidoras de manosidase, e interferem na produção de glicoproteínas e na modulação imune (ZIMMERMANN, 2007b).

As toxinas produzidas por fungos do gênero *Beauveria* são igualmente bastante estudadas, causando sintomas como convulsão, falta de coordenação,

alteração de comportamento, atividade anti-alimentar e paralisia (CITO *et al.*, 2016). A beauvericina é um hexadepsipeptídeo cíclico produzido por *B. bassiana* e *Cordyceps fumosorosea*, e age aumentando a concentração de íons cálcio no citoplasma, causando a depleção de ATP e ativando a apoptose celular (GIBSON *et al.*, 2014). A bassianolida é um octadepsipeptídeo cíclico produzido por *Beauveria* e *Lecanicillium*, que atua inibindo a contração muscular do inseto. Tenelina, bassianina, beauverolida, bassiatina e oosporeína são outras moléculas produzidas por *Beauveria* spp. relacionadas com atividade inseticida (GIBSON *et al.*, 2014; MC NAMARA *et al.*, 2019).

Também foi verificado que fungos do gênero *Cordyceps* produzem beauvericina e beauverolida, além de fumosorinona, terpeno de estrutura similar à tenelina que atua como inibidor de tirosina fosfatase. Compostos orgânicos voláteis repelentes a insetos também foram identificados em *I. fumosorosea*, como terpenos, aldeídos e cetonas (WENG *et al.*, 2019).

A resposta do sistema imune do inseto inclui a liberação de peptídeos antimicrobianos, produção de formas reativas de oxigênio e nitrogênio, encapsulação celular, fagocitose e melanização da hemolinfa (MC NAMARA *et al.*, 2018; WANG; LOVETT; ST. LEGER, 2019). A injeção de fermentado de fungos entomopatogênicos em *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae) indicou redução de inibidores de protease, enzimas detoxificantes, peptídeos antimicrobianos e proteínas de detecção, além de reduzir o tamanho da larva (MC NAMARA *et al.*, 2018). Isso indica que o uso combinado de toxinas e fungos entomopatogênicos é uma estratégia a ser utilizada no MIP (RESQUÍN-ROMERO; GARRIDO-JURADO; QUESADA-MORAGA, 2016), uma vez que estas toxinas modulam a resposta imune do inseto, deixando-o mais suscetível à colonização pelo entomopatógeno (MC NAMARA *et al.*, 2018).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba (SP): Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos e Alimentos**. 2016. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home> > (acesso em fevereiro de 2019).

AMATUZZI, R.F. **Prospecção de fungos entomopatogênicos de solos agrícolas e mata nativa para o controle de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em morangueiro**. 115 f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

AMATUZZI, R.F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; DALZOTO, P.; ZAWADNEAK, M.A.; PIMENTEL, I.C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.78, n.3, p.429-435, 2018.

AMATUZZI, R.F.; POITEVIN, C.G.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, v.9, n.2, p.70, 2018.

ANTUNES, L.E.C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J.E. **Morangueiro**. Brasília (DF): Embrapa, 2016.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. **The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida**. 2010. Disponível em <<http://www.freshfromflorida.com/content/download/23893/486212/duponchelia-fovealis.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

CABI. **Centre for Agriculture and Bioscience International**. 2019. Disponível em <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/20168>> (acesso em fevereiro de 2019).

CITO, A.; BARZANTI, G.P.; STRANGI, A.; FRANCARDI, V.; ZANFINI, A.; DREASSI, E. Cuticle-degrading proteases and toxins as virulence markers of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Journal of Basic Microbiology**, v.56, n.9, p.941-948, 2016.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v.46, p.387-400, 2001.

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.D.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.109-120, 2011.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2019. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#search/Strawberries>> (acesso em fevereiro de 2019).

GIBSON, D.M.; DONZELLI, B.G.; KRASNOFF, S.B.; KEYHANI, N. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports**, v.31, n.10, p.1287-1305, 2014.

GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORIFEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms

into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v.89, n.2, p.295-311, 2016.

HAJEK, A.E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**, v.55, p.147-158, 2010.

HEGEDUS, D.D.; BIDOCHKA, M.J.; MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.6, p.785-789, 1992.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.180-187, 1997.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. **Bioresource Technology**, v.102, p.3169-3175, 2011.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2019. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> (acesso em fevereiro de 2019).

MARTINS, D.S.; STRASSBURGER, A.S.; PEIL, R.M.N.; SCHWENGBER, J.E.; REISSER JUNIOR, C.; FURTADO, L.G. Fisiologia da produção do morangueiro. In: **Morangueiro irrigado: aspectos técnicos e ambientais do cultivo**. Edição: TIMM, L.C.; TAVARES, V.E.Q.; REISSER JUNIOR, C.; ESTRELA, C.C. Pelotas (RS): Embrapa Clima Temperado, 2009.

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DELALIBERA JR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.127, p.11-20, 2015.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; QUINTELA, E.D.; DELALIBERA JR, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, v.66, p.209-218, 2013.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; VITAL, R.C.J.; JACKSON, M.A.; QUINTELA, E.D. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.1583-1590, 2014.

MASCARIN, G.M.; LOPES, R.B.; DELALIBERA JR, I.; FERNANDES, E.K.K.; LUZ, C.; FARIA, M. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, in press, 2018.



MC NAMARA, L.; DOLAN, S.K.; WALSH, M.D.; STEPHENS, J.C.; GLARE, T.R.; KAVANAGH, K.; GRIFFIN, C.T. Oosporein, an abundant metabolite in *Beauveria caledonica*, with a feedback induction mechanism and a role in insect virulence. **Fungal Biology**, in press, 2019.

MC NAMARA, L.; GRIFFIN, C.T.; FITZPATRICK, D.; KAVANAGH, K.; CAROLAN, J.C. The effect of entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response and haemolymph proteome of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.101, p.1-13, 2018.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M.J. Insect pathogenic fungi as endophytes. **Advances in Genetics**, v.94, p.107-135, 2016.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O.; QUESADA-MORAGA, E. Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.23, n.10, p.1199-1212, 2013.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p.52-76, 2012.

PAES, J.P.P.; LIMA, V.L.S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J.R.; BUENO, R.C.O.F. Selection of parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and parasitism at different eggs ages of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.40, p.e42216, 2018.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo (SP): Editora Manole, 2002.

PEDRAS, M.S.C.; ZAHARIA, L.I.; WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, v.59, n.6, p.579-596, 2002.

PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, D.C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **BioControl**, v.55, p.187-198, 2010.

PIROVANI, V.D.; PRATISSOLI, D.; TIBÚRCIO, M.O. CARVALHO, J.R.D.; DAMASCENA, A.P.; FARIA, L.V. *Trichogramma galloi* and *Trichogramma pretiosum* for the management of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in strawberry plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.8, p.690-693, 2017.

POITEVIN, C.G.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.53, n.3, p.323-331, 2018.



PRAKASH, G.V.S.B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R.R.S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.99, p.1530-1537, 2008.

QUESADA-MORAGA, E.; CARRASCO-DÍAZ, J.A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v.130, n.8, p.442-452, 2006.

QUESADA-MORAGA, E.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, I. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In: **Advances in Endophytic Research**. Edição: VERMA, V.C.; GANGE, A.C. New Delhi: Springer India, 2014.

RESQUÍN-ROMERO, G.; GARRIDO-JURADO, I.; QUESADA-MORAGA, E. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.92, p.101-110, 2016.

ROBL, D.; SUNG, L.B.; NOVAKOVICH, J.H.; MARANGONI, P.R.D.; ZAWADNEAK, M.A.C.; DALZOTO, P.R.; GABARDO, J.; PIMENTEL, I.C. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.296-300, 2009.

RODRIGUES, R.; JARAS, L.I.; POLTRONIERI, A.S.; PIMENTEL, I.C.; ZAWADNEAK, M.A.C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **EntomoBrasilis**, v.10, n.1, p.26-32, 2017.

RODRIGUEZ-LEON, J.A.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; RODRÍGUEZ, D.E. **Factors affecting solid-state fermentation**. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation, p. 26-47, 2007.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v.56, p.1267-1274, 2010.

SILVA, J.N.; MASCARIN, G.M.; GOMES, I.C.S.; TINÔCO, R.S.; QUINTELA, E.D.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. New cost-effective bioconversion process of palm kernel cake into bioinsecticides based on *Beauveria bassiana* and *Isaria javanica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n.6, p.2595-2606, 2018.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

STENBERG, J.A. A conceptual framework for integrated pest management. **Trends in Plant Science**, v.22, n.9, p.759-769, 2017.

STOCKS, S.D.; HODGES, A. **European pepper moth or Southern European marsh pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. 2012. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN91000.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.81, p.146-161, 2013.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v.57, p. 1-20, 2012.

VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W.J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v.63, n.1, p.39-59, 2017.

VEGA, F.E.; GOETTEL, M.S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v.2, p.149-159, 2009.

VICCINI, G.; MANNICH, M.; CAPALBO, D.M.F.; SANHUEZA, R.V.; MITCHELL, D.A. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. **Process Biochemistry**, v.42, p.275-278, 2007.

WANG, J.; LOVETT, B.; ST. LEGER, R.J. The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. **Fungal Ecology**, v.38, p.7-11, 2019.

WENG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, W.; HU, Q. Secondary metabolites and the risks of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Molecules**, v.24, n.4, p.664, 2019.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; PIMENTEL, I.C.; SCHUBER, J.M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A.S.; ALMA SOLIS, M. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, n.3, p.91-95, 2016.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; POLTRONIERI, A.S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A.M. BORBA, A.M.; PIMENTEL, I.C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v.114, p.291-294, 2017.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.6, p.553-596, 2007a.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.9, p.879-920, 2007b.

## CAPÍTULO 2. SELEÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA CONTROLE BIOLÓGICO DE *Duponchelia fovealis*

Carolina Gracia Poitevin, Rafaela Ferreira Amatuzzi, Mariana Vieira Porsani, Alex Sandro Poltronieri, Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, Ida Chapaval Pimentel

### RESUMO

A lagarta *Duponchelia fovealis* é uma praga exótica responsável por significativos danos à cultura do morangueiro no Brasil. Seu controle não está bem estabelecido, e a utilização de controle biológico vem se mostrando uma alternativa viável para o manejo da praga. Sendo assim, o objetivo deste capítulo foi selecionar fungos entomopatogênicos capazes de controlar lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* em testes de patogenicidade em folhas de morangueiro. Cinco linhagens, pertencentes às espécies *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica* e *Purpureocillium lilacinum*, ocasionaram as maiores taxas de mortalidade, entre 62,2% e 87,9%, demonstrando seu potencial como agentes de controle biológico.

Palavras-chave: Lagarta-da-coroa, morangueiro, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, *Purpureocillium lilacinum*

### 1 INTRODUÇÃO

A cultura de morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duschene) é de grande importância sócio-econômica no Brasil. Entretanto, é bastante suscetível à incidência de pragas, o que demanda a aplicação sistemática de defensivos agrícolas (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016). Quando utilizados de forma incorreta, estes defensivos apresentam risco de contaminação ambiental e humana (HOUBRAKEN *et al.*, 2016). Para reduzir o uso de inseticidas químicos, o controle biológico é uma importante ferramenta a ser empregada (MATYJASZCYK, 2015).

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), é uma praga exótica, e vem causando danos significativos em morangueiros no Brasil (ZAWADNEAK *et al.*, 2016), Portugal (FRANCO; BAPTISTA, 2010), Itália (BONSIGNORE; VACANTE, 2010) e Turquia (EFIL; ÖZGÜR; EFIL, 2014). O inseto ataca a coroa, folhas, flores e frutos, comprometendo a circulação de nutrientes e aumentando a exposição a fitopatógenos, e pode levar à morte da planta em casos

de infestações severas (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016; ZAWADNEAK *et al.*, 2016). Seu controle é dificultado devido ao hábito críptico das lagartas (BRAMBILA; STOCKS, 2010; ZAWADNEAK *et al.*, 2016), além da ausência de inseticidas validados no Brasil (MAPA, 2019). Todavia, estudos com agentes de controle biológico têm se mostrado eficientes na diminuição da população da praga (AMATUZZI *et al.*, 2018; PAES *et al.*, 2018; PIROVANI *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2017). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* a fungos entomopatogênicos depositados na Coleção Microbiológica da Rede Paranaense.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Preparo de inóculo

Foram testados 36 fungos entomopatogênicos, isolados de diferentes substratos (TABELA 1), que estão depositados na Coleção Microbiológica da Rede Paranaense (TaxOnline). Para o preparo do inóculo, colônias monospóricas foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (peptona 10 g.L<sup>-1</sup>, dextrose 40 g.L<sup>-1</sup>, ágar bacteriológico 15 g.L<sup>-1</sup>, água destilada qsp 1 L) durante 14 dias a 28 ± 2°C e fotofase de 12 horas. Após este período, a superfície de crescimento foi raspada com uma espátula esterilizada e os esporos adicionados em solução salina NaCl 0,85% com Tween<sup>®</sup>80 0,01%. A suspensão foi agitada vigorosamente e então filtrada em gaze. A concentração final de esporos foi estimada com o auxílio de um hemocitômetro.

TABELA 1 – FUNGOS ENTOMOPATOGENÉTICOS AVALIADOS QUANTO AO POTENCIAL DE MORTALIDADE CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO INSTAR DE *Duponchelia fovealis*

<b>Linagem</b>	<b>Identificação</b>	<b>Acesso Genbank</b>	<b>Substrato</b>	<b>Local</b>
PAE RG3	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	KF255397	Ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	Lima (Peru)
PAE 2KK	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	KF255398	Ovos de <i>Meloidogyne incognita</i>	Lima (Peru)
PAE 69	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	KF255399	Endofítico soja ( <i>Glycine max</i> L.)	Pinhais (PR)
Ins	<i>Akanthomyces</i> sp.	KY471666	Solo morangueiro	Morretes (PR)
Isa340	<i>Cordyceps javanica</i>	KY488507	Solo floresta nativa	Morretes (PR)
104	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471656	Solo floresta nativa	Morretes (PR)
107	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471657	Solo floresta nativa	Morretes (PR)
110B	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471658	Solo bananeira	Morretes (PR)
110C	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471659	Solo bananeira	Morretes (PR)
110D	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471660	Solo bananeira	Morretes (PR)
315	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471661	Solo bananeira	Morretes (PR)
381	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471662	Solo bananeira	Morretes (PR)
399A	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471663	Solo bananeira	Morretes (PR)
399B	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471664	Solo bananeira	Morretes (PR)
399C	<i>Metarhizium anisopliae</i>	KY471665	Solo bananeira	Morretes (PR)
Bea1	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471648	Solo milho	Araucária (PR)
Bea2	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471649	Solo milho	Araucária (PR)
Bea3	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471650	Solo milho	Araucária (PR)
Bea4	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471651	Solo milho	Araucária (PR)

Continuação TABELA 1 – FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS AVALIADOS QUANTO AO POTENCIAL DE MORTALIDADE CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis*

<b>Linhagem</b>	<b>Identificação</b>	<b>Acesso Genbank</b>	<b>Substrato</b>	<b>Local</b>
Bea5	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471652	Solo milho	Araucária (PR)
Bea111	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471653	Solo milho	Araucária (PR)
A2B	<i>Beauveria bassiana</i>	KY471654	Solo milho	Araucária (PR)
Bea110	<i>Beauveria caledonica</i>	KY471655	Solo morangueiro	Morretes (PR)
B1	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751846	Reduviidae (Hemiptera)	São José dos Pinhais (PR)
B2	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751847	Reduviidae (Hemiptera)	São José dos Pinhais (PR)
B3	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751848	Chrysomelidae (Coleoptera)	São José dos Pinhais (PR)
B4	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751849	Chrysomelidae (Coleoptera)	São José dos Pinhais (PR)
B5	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751850	Reduviidae (Hemiptera)	São José dos Pinhais (PR)
B6	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751851	Chrysomelidae (Coleoptera)	São José dos Pinhais (PR)
B7	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751852	Hymenoptera	São José dos Pinhais (PR)
B8	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751853	Nitidulidae (Coleoptera)	São José dos Pinhais (PR)
B9	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751854	Lepidoptera	São José dos Pinhais (PR)
B10	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751855	Reduviidae (Hemiptera)	São José dos Pinhais (PR)
B11	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751856	Reduviidae (Hemiptera)	São José dos Pinhais (PR)
B12	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751857	Chrysomelidae (Coleoptera)	São José dos Pinhais (PR)
B13	<i>Beauveria bassiana</i>	KU751858	Chrysomelidae (Coleoptera)	São José dos Pinhais (PR)

Fonte: O autor (2016)

## 2.2 Criação de *D. fovealis*

Os adultos de *D. fovealis* foram coletados em cultivo de morangueiro em São José dos Pinhais (25°37'S, 49°04'E), e foram mantidos em gaiolas de polipropileno recobertas com papel sob condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa (U.R.) de  $60 \pm 10\%$ , fotofase de 14 horas). A cobertura de papel com ovos foi trocada diariamente, e as lagartas mantidas em dieta artificial (ZAWADNEAK *et al.*, 2017).

## 2.3 Seleção de fungos (adaptado de QUESADA-MORAGA *et al.*, 2006)

Em uma caixa plástica gerbox, foi colocado uma folha de morango com o pecíolo mergulhado em água de forma a permitir a hidratação dos folíolos. Então, dez lagartas de terceiro ínstar foram adicionadas com o auxílio de um pincel de ponta fina. Uma suspensão de esporos com concentração de  $1,5 \times 10^9$  esporos.mL<sup>-1</sup> foi pulverizada sobre as lagartas com um aerógrafo Sagyma com pressão de 10 PSI. O controle foi pulverizado com água destilada. As caixas contendo as folhas infestadas foram incubadas em estufa *Biological Oxygen Demand* (BOD) a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R. de  $60 \pm 10\%$ , fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. As avaliações de mortalidade foram realizadas utilizando como critérios a resposta da lagarta ao toque, coloração e textura do tegumento. Os insetos mortos foram colocados em placas de Petri com papel filtro umedecido até exteriorização do fungo e confirmação do agente causal em lâmina a fresco. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições, totalizando 50 lagartas por tratamento.

A mortalidade foi corrigida em relação à mortalidade do controle (ABBOTT, 1925). O teste de normalidade foi realizado, seguido de análise de variância ao nível de 5% de probabilidade e teste de Scott-Knott para avaliação das médias. Os resultados foram analisados com o software ASSISTAT 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2009).

## 2.4 Estimativa da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e tempo letal médio (TL<sub>50</sub>)

As CL<sub>50</sub> e TL<sub>50</sub> foram estimadas para as linhagens que causaram maior mortalidade de larvas e para os bioinseticidas comerciais Methamax<sup>®</sup> (*Metarhizium anisopliae* isolado IBCB 348) e Bovemax<sup>®</sup> (*Beauveria bassiana* isolado CG716)



(Novozymes BioAg). As pulverizações foram realizadas conforme descrito anteriormente (item 2.3), sendo as suspensões testadas de concentração variando entre  $1,5 \times 10^4$  e  $1,5 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>. A avaliação foi feita diariamente por 7 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições, totalizando 50 lagartas por tratamento. A CL<sub>50</sub> e o TL<sub>50</sub> foram calculados por análise de Probit com o software PoloPlus (ROBERTSON *et al.*, 2007).

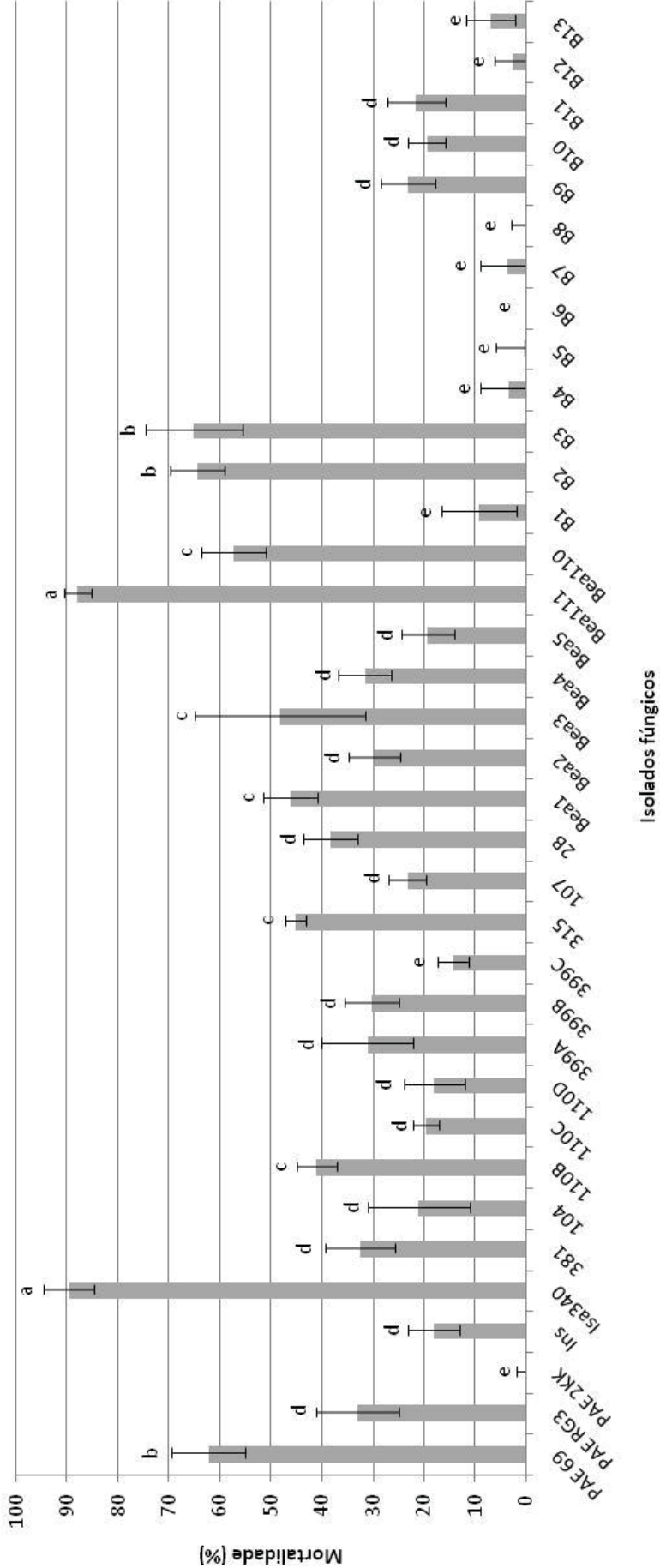
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Seleção de fungos entomopatogênicos

Quando testadas em avaliação de patogenicidade *in vitro*, as lagartas de terceiro instar de *D. fovealis* apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade às suspensões fúngicas, com mortalidade variando entre 2,7 e 89,6% (FIGURA 1). As linhagens que apresentaram melhores resultados, e diferiram significativamente dos demais ( $F = 14,31$ , g.l.= 36,  $p < 0,0001$ ) foram Isa340 (*C. javanica*) e Bea111 (*B. bassiana*), 89,6% e 87,9%, respectivamente. As linhagens B2, B3 (*B. bassiana*) e PAE 69 (*P. lilacinum*) também apresentaram mortalidade significativa, respectivamente 64,4%, 65,1% e 62,2%. As linhagens de *Metarhizium anisopliae* e *Lecanicillium* sp. apresentaram mortalidade mais baixa, variando entre 14,3 e 45,1%.

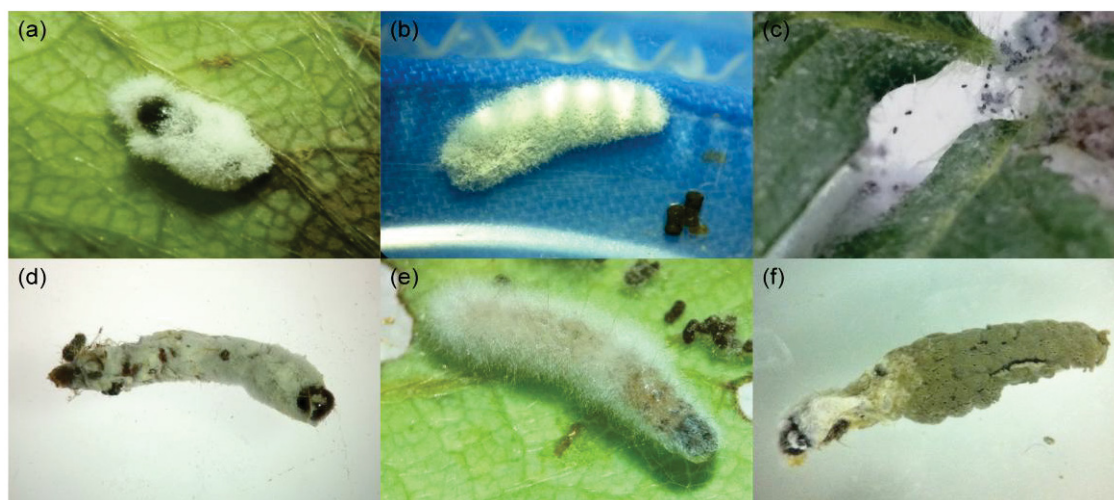
Após incubação em câmara úmida, foi verificada a exteriorização dos fungos em 100% das larvas mortas, com diferentes graus de crescimento (FIGURA 2).

FIGURA 1 - MORTALIDADE (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADAS COM SUSPENSÃO FÚNGICA DE CONCENTRAÇÃO  $1,5 \times 10^9$  ESPOROS.mL<sup>-1</sup>, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R. DE  $60 \pm 10\%$  E FOTOFASE DE 12 HORAS



Fonte: O autor (2016)  
Nota: Análise estatística pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,0001$ ). Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

FIGURA 2 – EXTERIORIZAÇÃO DOS FUNGOS NAS LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis*, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R. DE  $60 \pm 10\%$  E FOTOFASE DE 12 HORAS. (a) *Beauveria bassiana* (B2), (b) *Cordyceps javanica* (Isa340), (c) *Purpureocillium lilacinum* (PAE 69), (d) *Beauveria caledonica* (Bea110), (e) *Akantomyces* sp. (Ins), (f) *Metarhizium anisopliae* (315)



Fonte: O autor (2016)

### 3.2 Estimativa da concentração letal média ( $CL_{50}$ ) e tempo letal médio ( $TL_{50}$ )

A análise de Probit revelou diferenças na virulência entre os tratamentos. A linhagem mais virulenta foi B2, que teve a menor  $CL_{50}$ ,  $6,4 \times 10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> (TABELA 2), sem sobreposição do intervalo de confiança com outros fungos. As linhagens Bea111 e Isa340 não foram estatisticamente diferentes, e também apresentaram os maiores coeficientes angulares (slopes das regressões). Os bioinseticidas e B3 foram menos virulentos, pois apresentaram as maiores  $CL_{50}$ .

O  $TL_{50}$  na concentração de  $1,5 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup> também variou entre os tratamentos. O menor tempo foi da linhagem B2, de 3,9 dias, aproximadamente 1,5x menor que o tempo médio para Bovemax® (5,9 dias) (TABELA 3). Os tratamentos com Isa340, Bea111 e Bovemax® tiveram sobreposição do intervalo de confiança, o mesmo aconteceu entre a linhagem B3 e Methamax®.

TABELA 2 – ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO LETAL MÉDIA (CL<sub>50</sub>) POR ANÁLISE DE PROBIT DO TESTE DE VIRULÊNCIA COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E BIOINSETICIDAS CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25 ± 2°C, U.R. DE 60 ± 10% E FOTOFASE DE 12 HORAS

Tratamento	CL <sub>50</sub> (esporos.mL <sup>-1</sup> )	IC 95%	Coefficiente angular (±EP*)
Isa340	9,7 × 10 <sup>5</sup>	5,8 × 10 <sup>5</sup> – 3,1 × 10 <sup>6</sup>	0,37 ± 0,03
Bea111	2,3 × 10 <sup>6</sup>	8,9 × 10 <sup>5</sup> – 5,3 × 10 <sup>6</sup>	0,51 ± 0,04
B2	6,4 × 10 <sup>4</sup>	1,7 × 10 <sup>4</sup> – 1,9 × 10 <sup>5</sup>	0,32 ± 0,05
B3	6,8 × 10 <sup>8</sup>	6,8 × 10 <sup>7</sup> – 3,3 × 10 <sup>9</sup>	0,22 ± 0,06
Bovemax <sup>®</sup>	1,3 × 10 <sup>7</sup>	2,6 × 10 <sup>6</sup> – 2,9 × 10 <sup>8</sup>	0,22 ± 0,05
Methamax <sup>®</sup>	1,1 × 10 <sup>8</sup>	1,2 × 10 <sup>6</sup> – 3,2 × 10 <sup>10</sup>	0,16 ± 0,06

Fonte: O autor (2016)

\*erro padrão

TABELA 3 – ESTIMATIVA DO TEMPO LETAL MÉDIO (TL<sub>50</sub>) NA CONCENTRAÇÃO DE 1,5 × 10<sup>7</sup> ESPOROS.mL<sup>-1</sup> POR ANÁLISE DE PROBIT DO TESTE DE VIRULÊNCIA COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS E BIOINSETICIDAS CONTRA LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis*

Tratamento	TL <sub>50</sub> (dias)	IC 95%	Velocidade de morte (±EP*)
Isa340	6,4	5,4 – 8,3	2,81 ± 0,30
Bea111	7,2	6,4 – 8,6	3,13 ± 0,38
B2	3,9	3,6 – 4,2	4,28 ± 0,25
B3	11,3	8,8 – 21,1	1,89 ± 0,11
Bovemax <sup>®</sup>	5,9	5,2 – 7,0	2,81 ± 0,38
Methamax <sup>®</sup>	17,7	10,0 – 39,7	1,10 ± 0,29

Fonte: O autor (2016)

\*erro padrão

## 4 DISCUSSÃO

Fungos entomopatogênicos são inimigos naturais de insetos-praga, e seu uso como agente de controle biológico apresenta muitas vantagens, como segurança para humanos e organismos não-alvos e redução de resíduos de pesticidas no ambiente (MATYJASZCYK, 2015). Existem cerca de 90 gêneros de fungos causadores de doença em insetos, entretanto os fungos comercialmente produzidos pertencem aos gêneros *Beauveria*, *Cordyceps*, *Lecanicillium*, *Metarhizium* e *Purpureocillium*. Isso se deve à maior facilidade de produção massal,

armazenamento e formulação de bioprodutos à base desses microrganismos (GONZALEZ *et al.*, 2016; VEGA *et al.*, 2009).

Embora seja uma metodologia bem estabelecida para outros insetos-praga, estudos de controle biológico de *D. fovealis* com fungos ainda são escassos (AMATUZZI *et al.*, 2018). No presente estudo, quando testadas em avaliação de patogenicidade *in vitro*, as lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis* apresentaram diferentes níveis de suscetibilidade às suspensões fúngicas. A virulência de um isolado está diretamente relacionada com a sua capacidade de aderir e penetrar a cutícula do inseto, formar o apressório, escapar do sistema imune do inseto, colonizar órgãos e tecidos, e produzir metabólitos inseticidas (MOONJELY; BARELLI; BIDOCHKA, 2016; QUESADA-MORAGA; HERRERO; ZABALGOGEAZCOA, 2014).

As linhagens que apresentaram os melhores resultados pertencem às espécies *B. bassiana*, *C. javanica* e *P. lilacinum*, com taxas de mortalidade variando entre 62,2% e 87,9%. Resultados similares foram obtidos por AMATUZZI *et al.* (2018), que identificaram duas linhagens de *P. lilacinum* causando mortalidade de 80 e 88% em lagartas de 3º ínstar de *D. fovealis*.

A baixa virulência das linhagens de *M. anisopliae* pode estar associada à baixa adesão das proteínas de membrana dos esporos e o tegumento do inseto (MOONJELY; BARELLI; BIDOCHKA, 2016; WANG; ST. LEGER, 2013). Esporos de *M. anisopliae* têm seletividade para determinadas famílias de insetos, possivelmente devido a uma regulação na secreção de proteases durante a etapa de colonização da cutícula (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Todas as linhagens apresentaram exteriorização de fungos nas lagartas mortas. A incidência de micose é um fator importante dentro do controle biológico, já que maximiza a disseminação de esporos pelo ar sem a necessidade de reaplicação constante (ZIMMERMANN, 2007).

A linhagem B2 apresentou a menor concentração e tempo letal médio, seguida de Isa340 e Bea111. Estudos de seleção de isolados de *B. bassiana* capazes de matar lepidópteros demonstram a importância destes parâmetros, que indicam a sensibilidade do inseto a doença e o desenvolvimento de estratégias de controle (ALVES, 1998; ASI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2003, WRIGHT *et al.*, 2010). Para Methamax®, tanto CL<sub>50</sub> e quanto TL<sub>50</sub> foram altas, corroborando que *M. anisopliae* não é a espécie mais adequada para o controle de *D. fovealis*.

Sendo assim, este estudo demonstrou o potencial das linhagens de *B. bassiana* e *C. javanica* no controle biológico da lagarta-da-coroa, sugerindo uma alternativa ao uso de inseticidas químicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba (SP): Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

AMATUZZI, R.F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; DALZOTO, P.; ZAWADNEAK, M.A.; PIMENTEL, I.C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.78, n.3, p.429-435, 2018.

ANTUNES, L.E.C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J.E. **Morangueiro**. Brasília (DF): Embrapa, 2016.

ASI, M.R.; BASHIR, M.H.; AFZAL, M.; ZIA, K.; AKRAM, M. Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v.23, n.3, p.913-918, 2013.

BONSIGNORE, C.P.; VACANTE, V. *Duponchelia fovealis* (Zeller). Une nuova emergenza per la fragola. **Protezione delle colture**, v.3, p.40-43, 2010.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. **The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida**. 2010. Disponível em <<http://www.freshfromflorida.com/content/download/23893/486212/duponchelia-fovealis.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

EFIL, L.; ÖZGÜR, O.; EFIL, F. A new pest, *Duponchelia fovealis* Zeller, on strawberries in Turkey: damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.2, n.4, p.328-334, 2014.

FRANCO, M.C.; BAPTISTA, M.C. *Duponchelia fovealis* Zeller – nova peste em Portugal. **Frutas, Legumes e Flores**, v.110, p.34-35, 2010.

GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORI-FEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v.89, n.2, p.295-311, 2016.



HOUBRAKEN, M.; BAUWERAERTS, I.; FEVERY, D.; LABEKE, M.C.V.; SPANOGHE, P. Pesticide knowledge and practice among horticultural workers in the Lam Dong region, Vietnam: a case study of chrysanthemum and strawberries. **Science of the Total Environment**, v.550, p.1001-1009, 2016.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2019. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> (acesso em fevereiro de 2019).

MATYJASZCYK, E. Products containing microorganisms as a tool in integrated pest management and the rules of their market placement in the European Union. **Pest Management Science**, v.71, n.9, p.1201-1206, 2015.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M.J. Insect pathogenic fungi as endophytes. **Advances in Genetics**, v.94, p.107-135, 2016.

PAES, J.P.P.; LIMA, V.L.S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J.R.; BUENO, R.C.O.F. Selection of parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and parasitism at different eggs ages of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.40, p.e42216, 2018.

PIROVANI, V.D.; PRATISSOLI, D.; TIBÚRCIO, M.O. CARVALHO, J.R.D.; DAMASCENA, A.P.; FARIA, L.V. *Trichogramma galloi* and *Trichogramma pretiosum* for the management of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in strawberry plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.8, p.690-693, 2017.

QUESADA-MORAGA, E.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, I. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In: **Advances in Endophytic Research**. Edição: VERMA, V.C.; GANGE, A.C. New Delhi: Springer India, 2014.

QUESADA-MORAGA, E.; MARANHÃO, E.A.A. VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. **Biological Control**, v.36, p.274-287, 2006.

ROBERTSON, J.L.; RUSSELL, R.M.; PREISLER, H.K.; SAVIN, N.E. **Bioassays with Arthropods**, 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007.

RODRIGUES, R.; JARAS, L.I.; POLTRONIERI, A.S.; PIMENTEL, I.C.; ZAWADNEAK, M.A.C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **EntomoBrasilis**, v.10, n.1, p.26-32, 2017.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v.56, p.1267-1274, 2010.



SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture 7**. Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, V.C.A.; BARROS, R.; MARQUES, J.E.; TORRES, J.B. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.653-658, 2003.

VEGA, F.E.; GOETTEL, M.S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v.2, p.149-159, 2009.

WANG, C.; ST. LEGER, R.J. Genomics of entomopathogenic fungi. In: **The ecological genome of fungi**. Edição: MARTIN, F. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons Inc, 2013.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E.; AVERY, P.B.; JARONSKI, S.T.; VANDENBERG, J.D. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, n.3, p.186-199, 2010.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; PIMENTEL, I.C.; SCHUBER, J.M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A.S.; ALMA SOLIS, M. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, n.3, p.91-95, 2016.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; POLTRONIERI, A.S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A.M. BORBA, A.M.; PIMENTEL, I.C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v.114, p.291-294, 2017.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.6, p.553-596, 2007.

### **CAPÍTULO 3. OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA PRODUÇÃO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS PARA O CONTROLE DE *Duponchelia fovealis***

Carolina Gracia Poitevin, Rafaela Ferreira Amatuzzi, Franciele Baja, Fernanda Akemi Delgobo Ito, Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, Ida Chapaval Pimentel

#### **RESUMO**

A utilização de fungos entomopatogênicos é uma opção viável para o manejo da lagarta *Duponchelia fovealis* no morangueiro. Para obter um produto em escala comercial, uma etapa importante é a otimização da produção, de forma a selecionar o método de cultivo, o substrato e as condições físicas mais adequados. O objetivo deste capítulo foi otimizar e comparar a produção de esporos de *Beauveria bassiana* e *Cordyceps javanica* por cultivo semi-sólido (CSS), fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSub). O melhor desempenho em FES foi obtida com casca de soja de tamanho de partícula menor que 0,8 mm, altura de leito de 0,5 cm, cultivado por 12 dias a 27°C, pH 6,0 e umidade inicial de 80%. Para a FSub, a maior produção ocorreu em caldo V8, cultivado por 12 dias a 27°C, pH 6,0, agitação de 120 rpm para *C. javanica* e 140-160 rpm para *B. bassiana*. Quando comparados os esporos destas metodologias, os produzidos por FSub eram ligeiramente maiores, e a virulência contra *D. fovealis* foi maior com esporos de FES. Entretanto, rendimento, viabilidade, tamanho de esporo e virulência não se mostraram estatisticamente diferentes entre os métodos. Portanto, todos os métodos são viáveis para a produção de fungos entomopatogênicos visando a produção de bioinseticidas.

Palavras-chave: Lagarta-da-coroa, biocontrole, *Beauveria bassiana*, *Cordyceps javanica*, resíduos agroindustriais, meio de cultura

#### **1 INTRODUÇÃO**

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), vem causando danos severos em morangueiros no Brasil (ZAWADNEAK *et al.*, 2016). Esta lagarta ataca raízes, folhas, flores e frutos, e pode levar a planta à morte em infestações severas (STOCKS; HODGES, 2012; ZAWADNEAK *et al.*, 2016). No Brasil não há registro de produtos para o controle desta praga (MAPA, 2019), embora sejam utilizados pesticidas químicos em outros países (BRAMBILA; STOCKS, 2010; STOCKS; HODGES, 2012). Entretanto, devido a políticas internacionais visando à redução do uso de químicos na agricultura, alternativas de

controle têm sido estudadas (VAN LENTEREN *et al.*, 2017). O controle biológico utilizado dentro de um programa de manejo integrado de pragas (MIP) é uma das possíveis estratégias (ZAWADNEAK *et al.*, 2016). AMATUZZI *et al.* (2018) e POITEVIN *et al.* (2018) selecionaram fungos com potencial entomopatogênico contra *D. fovealis*, que apresentaram resultados satisfatórios em casa de vegetação mesmo não formulados.

Para que possam ser comercializadas, as linhagens entomopatogênicas devem ser produzidas em larga escala, preferencialmente com alto rendimento e baixos custos (JACKSON, 1997; ROBL *et al.*, 2009). Os fungos da ordem Hypocreales, como *Beauveria bassiana* e *Cordyceps fumosorosea*, são muito utilizados devido à maior facilidade na produção massal, armazenamento e formulação (GONZALEZ *et al.*, 2016).

A produção de biomassa de fungos é geralmente feita por dois métodos, fermentação submersa (FSub) ou fermentação em estado sólido (FES). Na FES, a matriz sólida atua como suporte de crescimento e substrato na quase ausência de água livre (JARONSKI, 2014), simulando um ambiente similar ao natural. Isso leva à produção de esporos mais estáveis, o que faz com que esta metodologia seja comumente escolhida (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Entretanto, o escalonamento da FES tem diversas limitações, como controle de temperatura, aeração, maior risco de contaminação e difícil recuperação dos esporos (JACKSON, 1997). Já a FSub utiliza um meio líquido agitado, que é mais fácil de controlar e recuperar a biomassa (MASCARIN *et al.*, 2015).

A primeira etapa para o desenvolvimento de um processo fermentativo é a otimização de variáveis físicas e químicas (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Entre os fatores nutricionais estão a fonte de carbono e nitrogênio e a razão carbono/nitrogênio do substrato, e os fatores físicos importantes são temperatura, umidade, aeração, pH e tamanho de partículas (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2007). Variações nas condições de cultivo podem produzir esporos morfologicamente e bioquimicamente diferentes (HEGEDUS *et al.*, 1992), o que pode influenciar no rendimento, estabilidade e infectividade dos mesmos (JACKSON, 1997). Sendo assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar o rendimento, viabilidade, germinação, tamanho e virulência dos esporos de *B. bassiana* e *Cordyceps javanica* produzidos por CSS, FES e FSub.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Criação de *D. fovealis* (ZAWADNEAK *et al.*, 2017)

As lagartas de *D. fovealis* foram mantidas em gaiolas sob condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa (U.R.) de  $60 \pm 10\%$ , fotofase de 14 horas) e mantidas em dieta artificial.

### 2.2 Produção do inóculo em cultivo semi-sólido (CSS)

Foram utilizadas as linhagens Bea111 (*B. bassiana*) e Isa340 (*C. javanica*). O inóculo foi obtido de culturas monospóricas cultivadas em Ágar semente de níger (semente de níger  $100 \text{ g.L}^{-1}$ , dextrose  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , ágar bacteriológico  $18 \text{ g.L}^{-1}$ ) a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias e fotofase de 12 horas (ITO; PIMENTEL; POITEVIN, 2019). Então, a superfície de crescimento foi transferida para solução salina NaCl 0,85% com Tween<sup>®</sup>80 0,01%. A suspensão foi agitada vigorosamente e então filtrada em gaze. A concentração final de esporos foi estimada com o auxílio de um hemocitômetro.

### 2.3 Otimização das variáveis físico-químicas para FES

#### 2.3.1 Seleção do substrato e influência da granulometria

Casca de café, casca de soja, casca de aveia, semente de níger e arroz parboilizado foram avaliados como substrato para cultivo sólido em frascos erlenmeyer de 50 mL. As cascas de café e de soja foram moídas previamente em moinho tipo Willey De Leo (Porto Alegre, RS, Brasil), e separados com peneirador eletromagnético Bertel (Caieras, SP, Brasil) em três tamanhos de partículas (menor que 0,8 mm, maior que 2 mm, e entre 2 mm e 0,8 mm). A casca de aveia apresentava partículas de tamanho menor que 0,8 mm, o arroz era maior que 2 mm e a semente de níger entre 0,8 e 2 mm.

A capacidade de absorção dos substratos foi estimada pesando-se 1 g do substrato e adicionando-se água destilada gota a gota até o momento em que o material não absorveu mais água. O pH foi determinado diluindo-se 10 g de amostra

em 100 mL de água destilada. A suspensão foi agitada e o pH determinado com pHmetro (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Em cada frasco foram colocados 5 g de substrato seco com a quantidade de água determinada anteriormente, menos um volume de 500 µL referente ao volume de inóculo adicionado posteriormente. Quando necessário, o pH inicial foi ajustado para 5,8 a 6,0 com ácido clorídrico 1 M. O substrato foi então homogeneizado e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Suspensões de esporos foram inoculadas na concentração de  $1 \times 10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> de substrato seco (SS), e homogeneizadas com bastão de vidro. Os frascos foram incubados em estufa BOD por 12 dias a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  (SANTA *et al.*, 2005).

Após esse período, foram adicionados aos frascos 30 mL de solução salina NaCl 0,85% com Tween<sup>®</sup>80 0,01%, e em seguida agitados a 100 rpm em temperatura ambiente por 30 min. Então a suspensão foi filtrada em gaze para contagem do número de esporos em hemocitômetro. O substrato e granulometria com maior produção foi selecionado para as etapas seguintes de otimização da fermentação sólida. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 9 tratamentos realizados em triplicata. Análise de variância ao nível de 5% de probabilidade por modelos lineares generalizados e teste de Tukey foram realizados utilizando o software Minitab 18 (Minitab Inc.).

### **2.3.2 Influência da altura do leito**

Foram avaliadas 3 alturas de leito para o cultivo sólido, 0,5 cm, 1 cm e 1,5 cm, o que equivale a 5 g, 9 g e 13 g, respectivamente, do substrato seco selecionado. O experimento foi conduzido conforme descrito anteriormente (item 2.3.1).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 3 tratamentos realizados em triplicata. Análise de variância ao nível de 5% de probabilidade por modelos lineares generalizados e teste de Tukey foram realizados utilizando o software Minitab 18 (Minitab Inc.).

### **2.3.3 Influência da temperatura, pH e umidade**

As variáveis físicas temperatura, pH e umidade inicial foram avaliadas em triplicata por planejamento fatorial completo  $2^{3-0}$  (TABELA 1), com 2 níveis e um

ponto central, totalizando 27 ensaios. A contagem de esporos foi feita após 12 dias, conforme descrito anteriormente (item 2.3.1). Os resultados foram analisados utilizando o software Minitab 18 (Minitab Inc.).

TABELA 1 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TEMPERATURA, pH E UMIDADE INICIAL PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS POR FES

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	24	27	30
Ph	5,5	6,0	6,5
Umidade inicial (%)	75	80	85

Fonte: O autor (2016)

## 2.4 Otimização das variáveis físico-químicas para FSub

### 2.4.1 Seleção do substrato e influência do volume de meio

O processo fermentativo foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo caldo Sabouraud (dextrose 40 g.L<sup>-1</sup>, peptona 10 g.L<sup>-1</sup>, água destilada qsp 1000 mL) ou caldo V8 (Suco V8 Campbell® Soup Co. 200 mL.L<sup>-1</sup>, carbonato de cálcio 3,2 g.L<sup>-1</sup>, água destilada qsp 1000 mL) nos volumes de 15 mL, 20 mL e 25 mL. A solução de esporos foi inoculada de forma a obter concentração final de  $1 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> (FENG; LIU; TZENG, 2000), e então os frascos foram incubados em estufa shaker a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  com agitação de 120 rpm por 12 dias.

Após este período, o caldo foi centrifugado a  $2500 \times g$  por 10 minutos, e o precipitado ressuspendido em 20 mL de solução salina NaCl 0,85% com Tween®80 0,01% para contagem do número de esporos em hemocitômetro. O meio e volume com maior produção de conídeos submersos foi selecionado para as etapas seguintes de otimização da fermentação submersa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 6 tratamentos realizados em triplicata. Análise de variância ao nível de 5% de probabilidade por modelos lineares generalizados e teste de Tukey foram realizados utilizando o software Minitab 18 (Minitab Inc.).

## 2.4.2 Influência da temperatura, pH e agitação

As variáveis físicas temperatura, pH e agitação foram avaliadas em triplicata por planejamento fatorial completo  $2^{3-0}$  (TABELA 2), com 2 níveis e um ponto central, totalizando 27 ensaios. A contagem de esporos foi feita após 12 dias, conforme descrito anteriormente (item 2.4.1). Os resultados foram analisados utilizando o software Minitab 18 (Minitab Inc.).

TABELA 2 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TEMPERATURA, pH E AGITAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS POR FSub

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	24	27	30
pH	5,5	6,0	6,5
Agitação (rpm)	90	120	150

Fonte: O autor (2016)

## 2.5 Cinética da produção de esporos

O inóculo foi adicionado aos substratos nas concentrações de  $1 \times 10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para FES e  $1 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup> para FSub. Então, cada substrato foi transferido para frascos Erlenmeyers de 50 mL conforme condições otimizadas anteriormente, de modo a evitar alterações na altura do leito ou no volume de caldo nas retiradas de amostra. A fermentação foi conduzida em estufa BOD (FES) ou estufa shaker (FSub), e incubados por 15 dias. Diariamente, três frascos de cada método eram retirados, e então era quantificada a concentração de esporos (itens 2.3.1 e 2.4.1).

## 2.6 Comparação entre os esporos produzidos por CSS, FES e FSub

Esporos produzidos por CSS, FES e FSub nas condições otimizadas foram avaliados quanto à germinação, viabilidade e estabilidade em armazenamento a frio, tamanho dos esporos e mortalidade de lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*.



### 2.6.1 Germinação

Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  das suspensões de esporos recuperadas de concentração  $1 \times 10^4$  esporos. $\text{mL}^{-1}$  foi espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalski na superfície de placas de Petri contendo meio Sabouraud dextrose (dextrose 40 g. $\text{L}^{-1}$ , peptona 10 g. $\text{L}^{-1}$ , ágar bacteriológico 15 g. $\text{L}^{-1}$ , água destilada qsp 1000 mL). O experimento foi realizado em triplicata, e a germinação dos esporos foi determinada após incubação em estufa BOD a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 h. Foram contados 200 esporos em microscópio óptico, e os mesmos eram considerados viáveis quando o tubo germinativo era maior que o seu diâmetro.

### 2.6.2 Viabilidade e estabilidade em armazenamento a frio

A viabilidade dos esporos recuperados na concentração de  $1 \times 10^4$  esporos. $\text{mL}^{-1}$  foi testada em suspensão e após liofilização, seguida de armazenamento em três temperaturas:  $4^\circ\text{C}$ , congelado a  $-20^\circ\text{C}$  e congelado a  $-80^\circ\text{C}$ . A suspensão mantida a  $4^\circ\text{C}$  consistiu apenas dos esporos diluídos em solução salina 0,85%, enquanto as congeladas consistiram em caldo Sabouraud com 20% e 10% de Dimetil sulfoxido (DMSO), respectivamente, para ajustes de densidade durante o congelamento. As amostras liofilizadas foram previamente diluídas em solução de leite desnatado 20%. Todas as amostras foram armazenadas em criotubos individualmente, para evitar problemas de congelamento-descongelamento, por até dois meses. Semanalmente, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  eram espalhadas sobre placas de Petri com meio Sabouraud dextrose em duas diluições em duplicata. As amostras liofilizadas eram ressuspensas em água destilada antes da inoculação. As placas foram incubadas em estufa BOD a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por três dias, quando foi determinado o número de unidades formadoras de colônias.

### 2.6.3 Tamanho

Suspensões de concentração  $1 \times 10^6$  esporos. $\text{mL}^{-1}$  foram preparadas em uma solução fixadora de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 24 h a  $4^\circ\text{C}$ . As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%) por 1 h (JEFFS *et al.*, 1999), e então

depositadas em pedaços de papel filtro Whatman n.4 até evaporação do etanol e recobertas com ouro com metalizador SCD030 – Balzers Union FL 9496 Balzers (Balzers, Liechtenstein). A observação foi feita ao microscópio eletrônico de varredura Vega3 (Tescan, República Tcheca), e as medições de diâmetro de *B. bassiana* e comprimento de *C. javanica* foram feitas com o software Atlas (Tescan). Foi realizada medição de, no mínimo, quatro esporos para cada metodologia.

#### **2.6.4 Bioensaio com *D. fovealis* (POITEVIN *et al.*, 2018)**

Em uma caixa plástica gerbox, foi colocada uma folha de morango com o pecíolo mergulhado em água de forma a permitir a hidratação dos folíolos. Então, dez lagartas de 3º ínstar foram adicionadas com o auxílio de um pincel de ponta fina. Um volume de 1 mL das suspensões com concentração de  $1,5 \times 10^6$  esporos.mL<sup>-1</sup>, valor equivalente a CL<sub>50</sub>, foi pulverizada sobre as lagartas com um aerógrafo Sagyma com pressão de 10 PSI. O controle foi pulverizado com solução salina NaCl 0,85% com Tween<sup>®</sup>80 0,01%, e as caixas incubadas em estufa BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , U.R. de  $60 \pm 10\%$ , fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. As avaliações de mortalidade foram realizadas utilizando como critérios a resposta da lagarta ao toque, coloração e textura do tegumento. Os insetos mortos foram colocados em placas de Petri com papel filtro umedecido até exteriorização do fungo e confirmação do agente causal em lâmina a fresco.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições, totalizando 100 lagartas por tratamento. A mortalidade foi corrigida em relação à mortalidade do controle (ABBOTT, 1925). O teste de normalidade foi realizado, seguido de análise de variância ao nível de 5% de probabilidade por modelos lineares generalizados e teste de Tukey para avaliação das médias. Os resultados foram analisados com o software Minitab 18 (Minitab Inc.).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Otimização das variáveis físico-químicas para FES

##### 3.1.1 Seleção do substrato e influência da granulometria

A capacidade de absorção de água, que equivale a umidade inicial, e o pH dos substratos são apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 – GRANULOMETRIA, QUANTIDADE DE ÁGUA ABSORVIDA (%) E pH DOS SUBSTRATOS TESTADOS

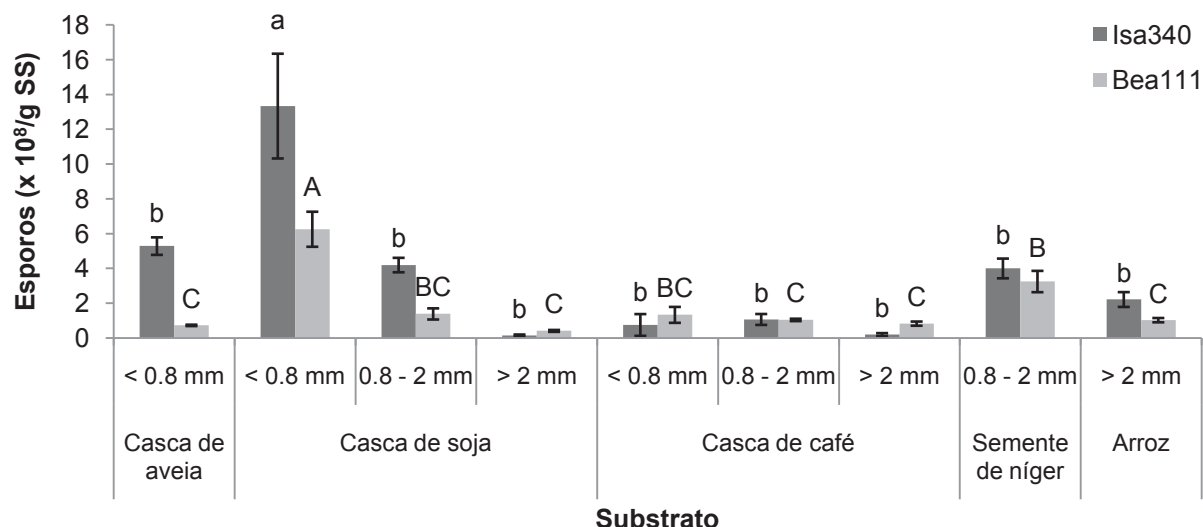
Substrato	Granulometria	Absorção de água (%)	pH
Casca de café	> 0,8 mm	60	6,1
	0,8 – 2 mm	50	6,2
	< 2 mm	30	6,2
Casca de soja	> 0,8 mm	80	6,2
	0,8 – 2 mm	40	6,1
	< 2 mm	30	5,9
Casca de aveia	> 0,8 mm	80	5,9
Semente de níger	0,8 – 2 mm	30	5,8
Arroz parboilizado	< 2 mm	30	6,3

Fonte: O autor (2016)

A casca de soja com granulometria inferior a 0,8 mm foi a que apresentou melhores resultados para ambos os fungos,  $1,3 \times 10^9$  e  $6,3 \times 10^8$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para Isa340 ( $F = 14,78$ , g.l. = 8,35,  $p < 0,0001$ ) e Bea111 ( $F = 17,78$ , g.l. = 8,35,  $p < 0,0001$ ), respectivamente (FIGURA 1). A produção de esporos também foi alta em semente de níger, aproximadamente  $3,7 \times 10^8$  esporos.g<sup>-1</sup> SS. No arroz, a produção de esporos foi intermediária, entre  $1,0 \times 10^8$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para Bea111 e  $2,2 \times 10^8$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para Isa340.

Para a casca de soja, a produção de esporos foi maior quanto menor o diâmetro das partículas,  $1,3 \times 10^9$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para granulometria menor que 0,8 mm e  $1,5 \times 10^7$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para partículas maiores que 2 mm. Já para a casca de café a esporulação foi maior para partículas de tamanho até 2 mm.

FIGURA 1 – INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO E GRANULOMETRIA NA PRODUÇÃO DE ESPOROS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE *Cordyceps javanica* E *Beauveria bassiana* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO A  $28 \pm 2^\circ\text{C}$



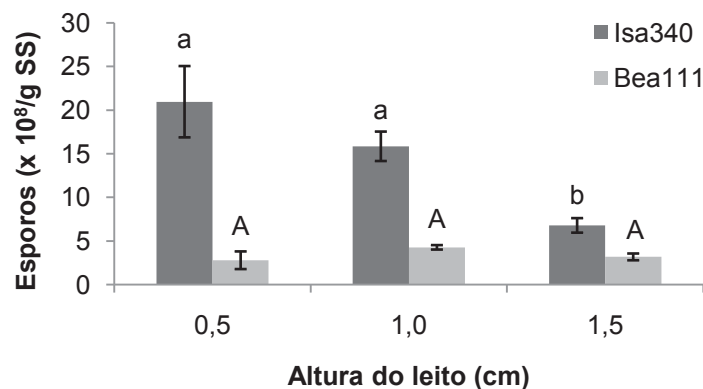
Fonte: O autor (2017)

Nota: Análise estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,0001$ ). Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

### 3.1.2 Influência da altura do leito

Para a linhagem Bea111, não houve influência da altura do leito ( $F = 1,67$ , g.l.= 2,8,  $p = 0,264$ ), enquanto que para o fungo Isa340 os leitos com 0,5 e 1 cm apresentaram produção de esporos 10 vezes maior que leito com 1,5 cm ( $F = 14,19$ , g.l.= 2,8,  $p = 0,005$ ) (FIGURA 2). Além disso, verificou-se que os tratamentos com leito de 1,5 cm foram mais propensos à contaminação.

FIGURA 2 – INFLUÊNCIA DA ALTURA DO LEITO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE *Cordyceps javanica* E *Beauveria bassiana* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO A  $28 \pm 2^\circ\text{C}$



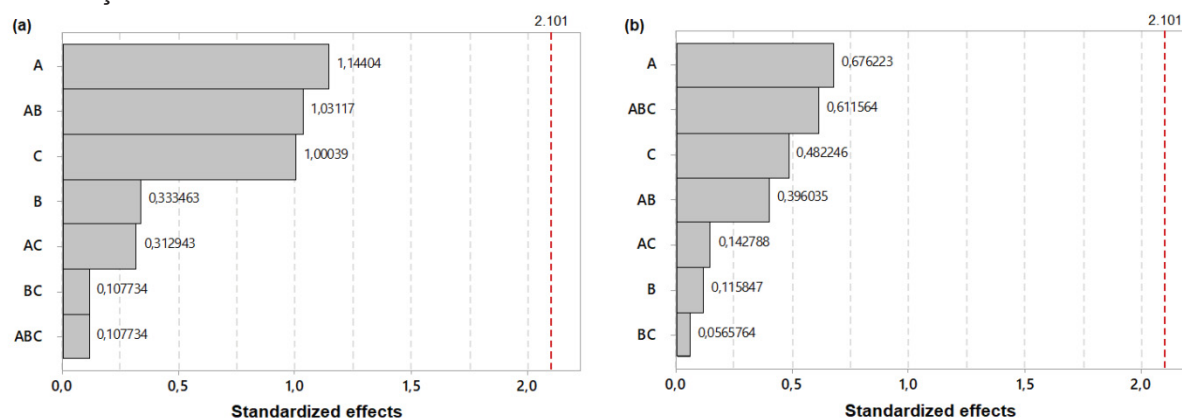
Fonte: O autor (2017)

Nota: Análise estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

### 3.1.3 Influência da temperatura, pH e umidade

Temperatura, pH e umidade inicial não afetaram significativamente nenhuma das linhagens dentro do espectro avaliado (FIGURA 3).

FIGURA 3 – DIAGRAMA DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE (a) *Cordyceps javanica* E (b) *Beauveria bassiana* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO



Fonte: O autor (2018)

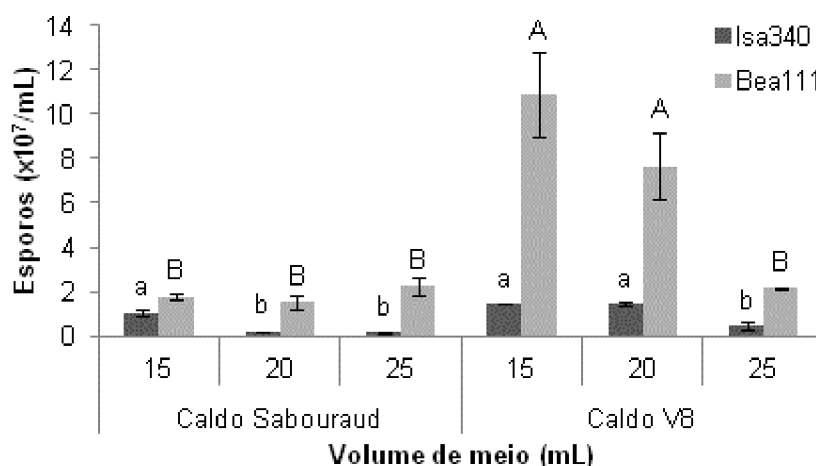
Nota: Fatores A, B e C correspondem a temperatura, pH e umidade inicial respectivamente ( $p = 0,05$ ).

## 3.2 Otimização das variáveis físico-químicas para FSub

### 3.2.1 Seleção do substrato e influência do volume de meio

O caldo V8 com 15 mL mostrou os melhores resultados para produção de esporos de Bea111 ( $1,1 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>) ( $F = 14,84$ , g.l. = 5.17,  $p < 0.0001$ ). Para Isa340, 15 mL e 20 mL de caldo V8 produziram  $1,46 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, resultados equivalentes a 15 mL de caldo Sabouraud ( $F = 29,03$ , g.l. = 5.17,  $p < 0.0001$ ) (FIGURA 4).

FIGURA 4 – INFLUÊNCIA DO SUBSTRATO E VOLUME DE MEIO NA PRODUÇÃO DE ESPOROS SUBMERSOS (MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO) DE *Cordyceps javanica* E *Beauveria bassiana* EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO A  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .



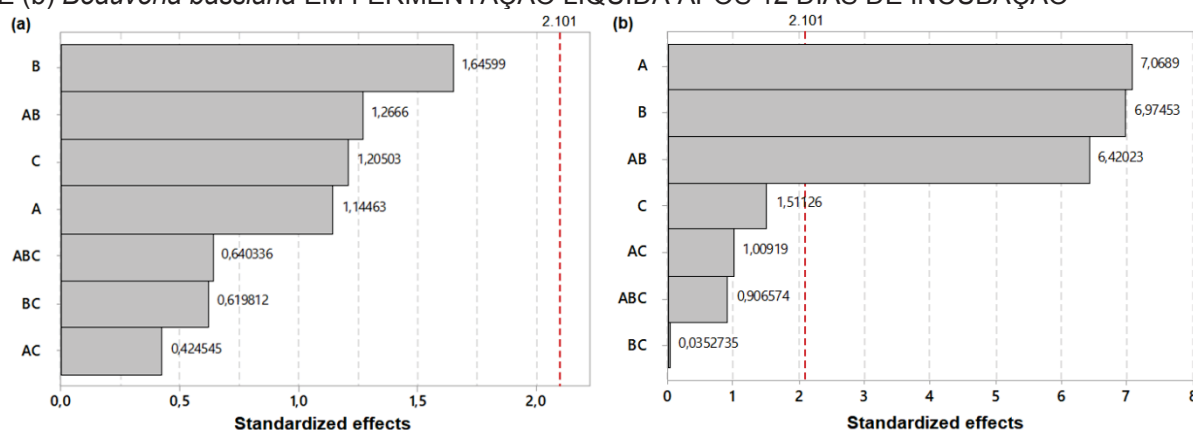
Fonte: O autor (2017)

Nota: Análise estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,0001$ ). Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

### 3.2.2. Influência da temperatura, pH e agitação

Temperatura, pH e agitação não foram significativos para Isa340 dentro do espectro avaliado (FIGURA 5a). Porém, temperatura, agitação e a interação destes fatores tiveram um efeito significativo na produção de esporos de Bea111 ( $p = 0,05$ ) (FIGURA 5b).

FIGURA 5 – DIAGRAMA DE PARETO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE (a) *Cordyceps javanica* E (b) *Beauveria bassiana* EM FERMENTAÇÃO LÍQUIDA APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO

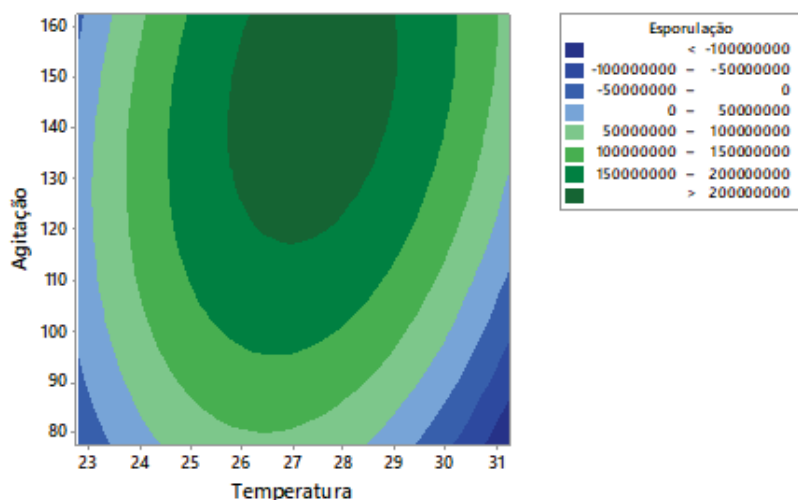


Fonte: O autor (2018)

Nota: Fatores A, B e C correspondem a temperatura, agitação e pH, respectivamente ( $p = 0,05$ ).

Para estimar a condição ótima para Bea111, um gráfico de contorno foi gerado para pH 6,0 (FIGURA 6). A produção máxima foi  $2,64 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>, obtida na temperatura de 27 – 28°C e agitação de 140 – 160 rpm.

FIGURA 6 – GRÁFICO DE CONTOURNO PARA PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *Beauveria bassiana* EM pH 6,0 APÓS 12 DIAS DE INCUBAÇÃO

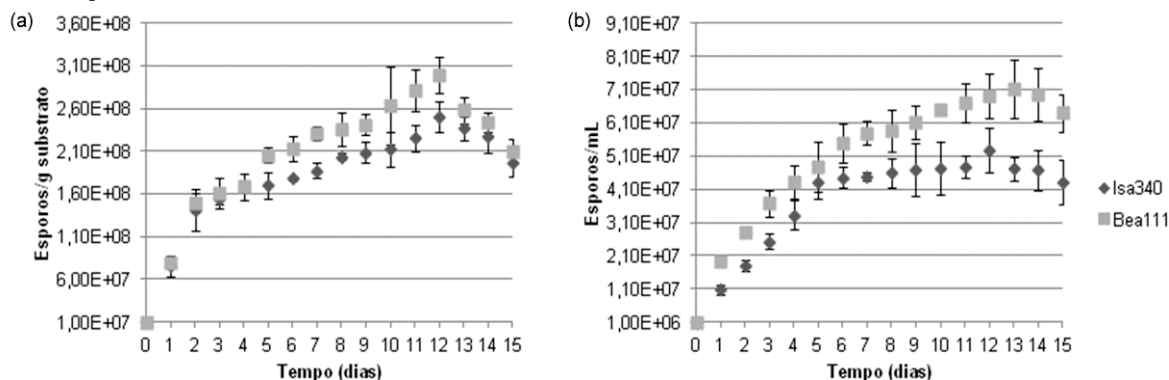


Fonte: O autor (2018)

### 3.3 Cinética da produção de esporos

A contagem de esporos foi máxima no 12º dia para Isa340 produzida por FSub,  $5,27 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, e para ambas as linhagens cultivadas em FES, sendo  $2,50 \times 10^8$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para *C. javanica* e  $2,99 \times 10^8$  esporos.g<sup>-1</sup> SS para *B. bassiana*. Para Bea111 em FSub, a esporulação atingiu o ápice,  $7,11 \times 10^7$  esporos.mL<sup>-1</sup>, no 13º dia (FIGURA 7).

FIGURA 7 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ESPOROS (MÉDIA ± ERRO PADRÃO) DE *Cordyceps javanica* E *Beauveria bassiana* POR (a) FES E (b) FSub, APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS



Fonte: O autor (2018)



### 3.4 Comparação entre os esporos produzidos por CSS, FES e FSub

A liofilização reduziu a viabilidade dos esporos em 60%; os esporos viáveis permaneceram com esta viabilidade por até dois meses em todas as condições testadas.

Não houve diferença estatística entre FES, FSub e CSS quanto à produção de esporos, tamanho do esporo e mortalidade de *D. fovealis* (TABELA 4). Nas condições ótimas, o rendimento de esporos variou entre  $2,3$  e  $3,5 \times 10^8$  esporos para Isa340 ( $F = 1,73$ , g.l. = 1,5,  $p = 0,259$ ) e  $2,5$  e  $2,6 \times 10^8$  esporos para Bea111 ( $F = 0,20$ , g.l. = 1,5,  $p = 0,675$ ), por g ou mL de meio.

TABELA 4 – RENDIMENTO, GERMINAÇÃO, TAMANHO E MORTALIDADE DE *D. fovealis* (MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO) PARA ESPOROS OBTIDOS POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO, FERMENTAÇÃO SUBMERSA E CULTIVO SEMI-SÓLIDO APÓS INCUBAÇÃO POR 12 DIAS NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS

Linhagem	Fermentação	Rendimento (Esporos $\times 10^8$ /g ou mL) <sup>a</sup>	Germinação (%)	Tamanho ( $\mu$ m) <sup>a</sup>	Mortalidade (%) <sup>a</sup>
Isa340	FES	$3,50 \pm 0,53$	$59,0 \pm 2,1$ b	$3,59 \pm 0,12$	$8,0 \pm 3,9$
	FSub	$2,33 \pm 0,72$	$96,6 \pm 0,3$ a	$3,98 \pm 0,13$	$2,3 \pm 1,5$
	CSS	ND <sup>b</sup>	$98,3 \pm 0,3$ a	$4,00 \pm 0,23$	$5,4 \pm 2,3$
Bea111	FES	$2,48 \pm 0,31$	$79,6 \pm 1,5$ b	$2,00 \pm 0,09$	$48,0 \pm 7,2$
	FSub	$2,64 \pm 0,16$	$99,3 \pm 0,3$ a	$2,01 \pm 0,07$	$24,6 \pm 6,5$
	CSS	ND <sup>b</sup>	$99,3 \pm 0,3$ a	$1,93 \pm 0,07$	$30,6 \pm 8,0$

Fonte: O autor (2018)

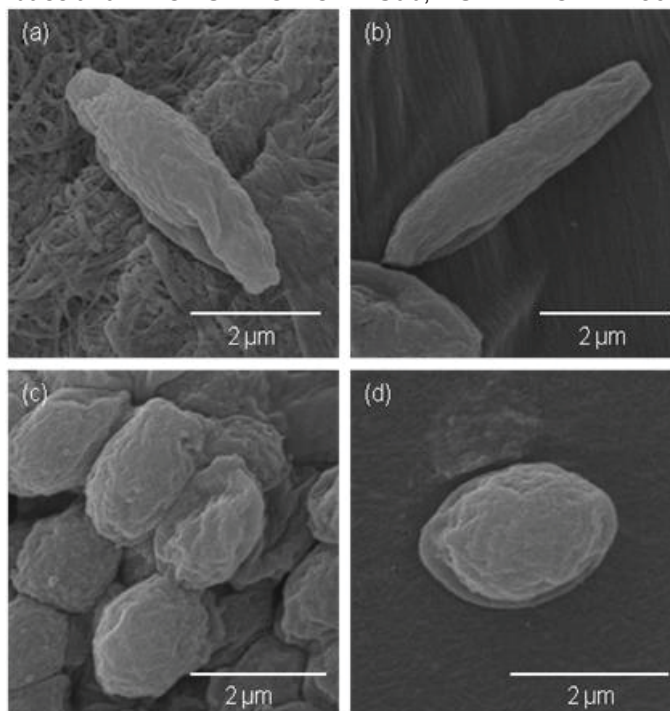
<sup>a</sup>sem diferença estatística pelo teste de Tukey

<sup>b</sup>não disponíveis

Esporos de FSub foram ligeiramente maiores, 10% para *C. javanica* e 0,5% para *B. bassiana*, em relação aos esporos de FES (FIGURA 8). Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Isa340:  $F = 1,05$ , g.l. = 2,16,  $p = 0,375$ ; Bea111:  $F = 0,37$ , g.l. = 2,27,  $p = 0,694$ ).

As médias de percentual de mortalidade das larvas de terceiro ínstar de *D. fovealis* foi maior em FES, aproximadamente 3,5 vezes maior para *C. javanica* e o dobro para *B. bassiana*. Ainda assim, não é estatisticamente significativo (Isa340:  $F = 1,09$ , g.l. = 2,27,  $p = 0,349$ ; Bea111:  $F = 2,81$ , g.l. = 2,27,  $p = 0,078$ ). Esporos de CSS tiveram mortalidade intermediária.

FIGURA 8 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DOS ESPOROS. (a) *Cordyceps javanica* PRODUZIDO POR FES, AUMENTO DE 30000X, (b) *Cordyceps javanica* PRODUZIDO POR FSub, AUMENTO DE 30000X, (c) *Beauveria bassiana* PRODUZIDO POR FES, AUMENTO DE 25000X, (d) *Beauveria bassiana* PRODUZIDO POR FSub, AUMENTO DE 25000X



Fonte: O autor (2018)

As taxas de germinação dos esporos de FES foram estatisticamente inferiores a FSub ou CSS (Isa340:  $F = 325,83$ , g.l. = 2,8,  $p < 0,0001$ ; Bea111:  $F = 165,76$ , g.l. = 2,8,  $p < 0,0001$ ), 40% e 20% a menos para Isa340 e Bea111, respectivamente.

## 4 DISCUSSÃO

A casca de soja foi o substrato que teve maior produção de esporos em FES para as duas linhagens. A soja é uma cultura de extrema importância para o agronegócio brasileiro, sendo o segundo maior produtor mundial com aproximadamente 117 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2019), e a casca é o resíduo produzido em maior quantidade. A casca, que representa cerca de 9% do grão, é composta principalmente de lignocelulose, que libera açúcares fermentescíveis como a glicose quando hidrolisado (CASSALES *et al.*, 2011). Pequenas quantidades de ácido, como o ácido clorídrico utilizado para correção do pH, podem desencadear a hidrólise da lignocelulose, o que faz da casca um substrato frequentemente utilizado em FES (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Por se tratar de um resíduo, o custo de

preparo do substrato é de menos de US\$ 0,10 por quilograma. Este valor é inferior ao do arroz parboilizado, que é o substrato usualmente utilizado na produção de fungos de controle biológico por FES em escala comercial (MASCARIN *et al.*, 2013; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013), de US\$ 0,63 por quilograma (MASCARIN *et al.*, 2015). Além disso, para os fungos testados, a produção de esporos no arroz foi seis vezes menor do que na casca de soja.

O Ágar semente de níger é um meio diferencial para diagnóstico de leveduras (LEES; BARTON, 2003; STAIB; MORSCHHÄUSER, 1999), e pela primeira vez foi verificado que é um meio bastante eficiente na produção de esporos de fungos filamentosos (ITO; PIMENTEL; POITEVIN, 2019). A semente também foi um substrato de produção significativa em FES.

A granulometria foi um fator importante na produção de esporos por FES para ambos os fungos. Geralmente resíduos de tamanho variando entre 0,8 e 2 mm são utilizados como substrato (ROBL *et al.*, 2009; SANTA *et al.*, 2005). Entretanto, nas partículas de diâmetro menor que 0,8 mm houve maior esporulação. Partículas menores formam uma malha com maior superfície de crescimento, o que justificaria a maior produção (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2007). Entretanto, partículas pequenas podem compactar o substrato, dificultando a transferência de calor e aeração, e interferindo na porosidade e capacidade de retenção de água (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2007; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013), o que faz com que a altura do leito seja outro fator importante a ser considerado.

Na FES, nenhum dos fatores físicos avaliados teve impacto significativo na produção de esporos, o que significa que as condições já estão dentro da faixa ideal. Para *B. bassiana*, a temperatura ótima é de 23 a 28°C (ZIMMERMANN, 2007), enquanto *Cordyceps* sp. tem uma faixa mais ampla, entre 20 e 30°C (ZIMMERMANN, 2008). A umidade inicial é uma característica relacionada ao substrato (JARONSKI, 2014; RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2007), todavia ambas as espécies dependem de alta umidade para germinação dos esporos (ZIMMERMANN, 2007; ZIMMERMANN, 2008). O pH ótimo para crescimento de fungos é mais ácido, entre 3,5 e 6,0 (RODRIGUEZ-LEON *et al.*, 2007).

Na FSub, o caldo V8 produziu mais esporos para as duas linhagens, e o custo médio de preparo é de US\$ 0,60 por litro de meio. Tanto o caldo V8 quanto Sabouraud são indefinidos, e contêm fontes complexas de carbono e nitrogênio, o que geralmente reduz o custo (JACKSON, 1997).

Mudanças no volume de meio e na agitação interferem no transporte de oxigênio (FENG; LIU; TZENG, 2000). Os dois fungos dependem de condições mais aeradas, uma vez que os volumes menores tiveram maior esporulação. Maiores velocidades de agitação também estimularam a produção de esporos para *Bea111*, e o rendimento após a otimização foi 2,4 vezes maior que o rendimento inicial.

A partir da cinética de produção, pode-se estabelecer o tempo ideal de cultivo de 12 dias; a partir deste momento a produção começa a diminuir uma vez que as culturas atingiram a fase de morte celular devido à depleção de nutrientes. Os fungos já iniciam a fase exponencial desde o primeiro dia porque a fase lag, que é um período de adaptação, ocorre nas pré-culturas (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Além de comparar os esporos produzidos por FES e FSub, os esporos obtidos em Ágar semente de níger também foram avaliados, uma vez que o cultivo dos fungos para a seleção inicial foi realizada em cultura semi-sólida (AMATUZZI *et al.*, 2018). Os esporos permaneceram viáveis por até 2 meses em todas as condições testadas, contrastando com os resultados de HEGEDUS *et al.* (1992), no qual a viabilidade reduziu em 50% após 1,4, 2 e 5,2 semanas a -20°C, 4°C e -70°C, respectivamente. Já a liofilização reduziu a viabilidade em 60%, indicando que o processo de secagem necessita de otimização.

O tamanho do esporo não interferiu na mortalidade de *D. fovealis*. Resultados similares foram verificados com o gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* (HEGEDUS *et al.*, 1992) e o nematoide *Meloidogyne javanica* (HOLLAND *et al.*, 2002). A metodologia empregada também não interferiu significativamente na mortalidade. O método de produção também não mostrou diferença na mortalidade e tempo de sobrevivência médio de *Diaphorina citri* (MORALEZ-REYES *et al.*, 2018) ou *Galleria melonella* (MUÑIZ-PAREDES *et al.*, 2016). Embora sutil, a variação na mortalidade também pode estar relacionada à utilização de diferentes fontes de nutrientes, já que os fatores nutricionais podem interferir não só no crescimento, mas também na infectividade (JACKSON, 1997).

Conclui-se, portanto, que tanto a FES quanto a FSub são estratégias economicamente viáveis para produção de inseticidas à base de *B. bassiana* e *C. javanica*, gerando uma alternativa sustentável de controle desta praga.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

AMATUZZI, R.F.; POITEVIN, C.G.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, v.9, n.2, p.70, 2018.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. **The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida**. 2010. Disponível em <<http://www.freshfromflorida.com/content/download/23893/486212/duponchelia-fovealis.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

CASSALES, A.; DE SOUZA-CRUZ, P.B.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v.35, n.11, p.4675-4683, 2011.

EMBRAPA. **Embrapa Soja**. 2019. Disponível em <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> (acesso em fevereiro de 2019).

FENG, K.C.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentation. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.25-29, 2000.

GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORIFEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v.89, n.2, p.295-311, 2016.

HEGEDUS, D.D.; BIDOCHKA, M.J.; MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.6, p.785-789, 1992.

HOLLAND, R. J.; GUNASEKERA, T.S.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, K.M. Ultrastructure and properties of *Paecilomyces lilacinus* spores. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, n.10, p.879-885, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ITO, F.A.D.; PIMENTEL, I.C.; POITEVIN, C.G. Niger seed agar induces sporulation of filamentous fungi with potential in biological control of agricultural diseases and pests. **International Journal of Microbiology Research**, 2019.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.180-187, 1997.

JARONSKI, S.T. **Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art.** In: MORALES-RAMOS, J.A.; ROJAS, M.G.; SHAPIRO-ILAN, D.I. Mass production of beneficial organisms, p. 357-413, 2014.

JEFFS, L.B.; XAVIER, I.J.; MATAI, R.E.; KHACHATOURIANS, G.G. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the general *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, n.11, p.936-948, 1999.

LEES, E.; BARTON, R.C. The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, n.1, p.13-17, 2003.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2019. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> (acesso em fevereiro de 2019).

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DELALIBERA JR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.127, p.11-20, 2015.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; QUINTELA, E.D.; DELALIBERA JR, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, v.66, p.209-218, 2013.

MORALES-REYES, C.; MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; HALL, D.; SÁNCHEZ-PEÑA, S.R.; ARTHURS, S.P. Comparison of aerial conidia and blastospores from two entomopathogenic fungi against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) under laboratory and greenhouse conditions. **Biocontrol Science and Technology**, p.1-13, 2018.

MUÑIZ-PAREDES, F.; GARZA-LÓPEZ, P.M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; LOERA, O. Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.32, n.7, p.111, 2016.

POITEVIN, C.G.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.53, n.3, p.323-331, 2018.

ROBL, D.; SUNG, L.B.; NOVAKOVICH, J.H.; MARANGONI, P.R.D.; ZAWADNEAK, M.A.C.; DALZOTO, P.R.; GABARDO, J.; PIMENTEL, I.C. Spore production in



*Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.296-300, 2009.

RODRIGUEZ-LEON, J.A.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; RODRÍGUEZ, D.E. **Factors affecting solid-state fermentation**. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation, p. 26-47, 2007.

SANTA, H.S.D.; SANTA, O.R.D.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.51-60, 2005.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

STAIB, P.; MORSCHHÄUSER, J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, v.42, n.9-10, p.521-524, 1999.

STOCKS, S.D.; HODGES, A. **European pepper moth or Southern European marsh pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. 2012. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN91000.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia**. Porto Alegre (RS): Artmed Editora, 2016.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.81, p.146-161, 2013.

VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W.J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v.63, n.1, p.39-59, 2017.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; PIMENTEL, I.C.; SCHUBER, J.M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A.S.; ALMA SOLIS, M. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, n.3, p.91-95, 2016.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; POLTRONIERI, A.S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A.M. BORBA, A.M.; PIMENTEL, I.C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v.114, p.291-294, 2017.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.6, p.553-596, 2007.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v.18, n.9, p.865-901, 2008.



## CAPÍTULO 4. ATIVIDADE INSETICIDA DO FERMENTADO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS CONTRA *Duponchelia fovealis*

Carolina Gracia Poitevin, Rafaela Ferreira Amatzuzi, Mariana Vieira Porsani, Miguel Daniel Nosedá, Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, Ida Chapaval Pimentel

### RESUMO

Fungos entomopatogênicos são naturalmente capazes de causar doenças em insetos, devido à produção de uma gama de metabólitos secundários tóxicos. Entretanto, sua ação sofre significativa interferência de fatores abióticos, como temperatura, umidade e pH, além de demandar um tempo maior até levar o inseto à morte. Sendo assim, a utilização das toxinas purificadas traz vantagens quanto ao tempo de ação e modo de aplicação. O objetivo deste capítulo foi avaliar a atividade inseticida de fermentados de *Beauveria bassiana*, *Beauveria caledonica*, *Metarhizium anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum* e *Cordyceps javanica* contra ovos e lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*, praga que vem causando danos em morangueiro no Brasil. Os fermentados foram produzidos em meio Adamek, e dialisados para separar as moléculas de peso molecular maiores e menores de 6-8 kDa. As frações causaram baixa mortalidade em ovos e lagartas de terceiro ínstar, e seus espectros de RMN-<sup>13</sup>C apresentaram pouca variação em relação ao do meio, o que significa que o meio Adamek não foi o mais adequado para a produção de moléculas inseticidas contra *D. fovealis*. Entretanto, as lagartas pulverizadas com as frações ficaram mais letárgicas, indicando possíveis danos secundários, o que pode levar a alterações de parâmetros biológicos importantes, como longevidade e capacidade reprodutiva.

Palavras-chave: Lagarta-da-coroa, Adamek, metabólitos secundários

### 1 INTRODUÇÃO

A lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), é nativa da região Mediterrânea e das Ilhas Canárias (BRAMBILA; STOCKS, 2010), mas está se estabelecendo em outras áreas da Europa e África, além do Oriente Médio, Índia e América (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016; STOCKS; HODGES, 2012). Esta praga tem ao menos 38 hospedeiros conhecidos (BRAMBILA; STOCKS, 2010), sendo o morangueiro o principal alvo no Brasil (ANTUNES; REISSER JUNIOR; SCHWENGBER, 2016; ZAWADNEAK *et al.*, 2016). Em outros países, seu controle é feito principalmente pelo uso de pesticidas químicos (BRAMBILA; STOCKS, 2010; STOCKS; HODGES, 2012), entretanto não

há inseticidas validados para uso no Brasil (MAPA, 2019). Em vista da demanda internacional pela redução do uso de defensivos químicos na agricultura, a utilização do manejo integrado de pragas (MIP) vem crescendo (STENBERG, 2017). Dentro do MIP, uma alternativa é a utilização de agentes de controle biológico, o que vem sendo amplamente estudado contra *D. fovealis* (AMATUZZI *et al.*, 2018a; AMATUZZI *et al.*, 2018b; PAES *et al.*, 2018; PIROVANI *et al.*, 2017; POITEVIN *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2017).

A eficácia dos conídios de fungos entomopatogênicos no campo está sujeita a fatores abióticos, como temperatura, umidade e pH (PELL; HANNAM; STEINKRAUS, 2010), além de ter um tempo de carência até levar o inseto à morte (MOONJELY; BARELLI; BIDOCHKA, 2016). Em muitos casos, estes fatores são responsáveis pela falta de adesão da parte dos produtores na consolidação do controle biológico utilizando entomopatógenos. Entretanto, fungos entomopatogênicos são naturalmente capazes de causar doenças em insetos, devido à produção de uma gama de metabólitos secundários tóxicos (GIBSON *et al.*, 2014). Destruxina, beauvericina, oosporeína e fumosorinona são alguns exemplos de moléculas com caráter inseticida produzidas por *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Beauveria caledonica* e *Cordyceps fumosorosea*, respectivamente (GIBSON *et al.*, 2014; MC NAMARA *et al.*, 2019; WENG *et al.*, 2019, ZIMMERMANN, 2007a; ZIMMERMANN, 2007b). Entre as vantagens da utilização da molécula a campo ao invés dos conídios estão o baixo período de carência, a biodegradabilidade e a facilidade de aplicação (ALVES, 1998).

O filtrado sem células obtido a partir do cultivo de *B. bassiana* ou *M. anisopliae* já demonstrou potencial inseticida e/ou anti-alimentar contra *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) (QUESADA-MORAGA; CARRASCO-DÍAZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006), *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) (ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2009), *Galleria melonella* (Lepidoptera: Pyralidae) (ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2010b), *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) (KIM *et al.*, 2013), *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) (DANIEL *et al.*, 2018), entre outros. Sendo assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar a atividade inseticida de fermentados de *B. bassiana*, *B. caledonica*, *M. anisopliae*, *Purpureocillium lilacinum* e *Cordyceps javanica* contra ovos e lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Fungos

Foram utilizadas as linhagens PAE 69 (*Purpureocillium lilacinum*), Isa340 (*Cordyceps javanica*), 315 (*Metarhizium anisopliae*), Bea110 (*Beauveria caledonica*) e Bea1, Bea3, Bea111, B2 e B3 (*Beauveria bassiana*), que causaram taxas de mortalidade de *D. fovealis* superiores a 45% (AMATUZZI *et al.*, 2018; POITEVIN *et al.*, 2018).

### 2.2 Produção do fermentado (adaptado de QUESADA-MORAGA; CARRASCO-DÍAZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006) e fracionamento em macro e micromoléculas

O fermentado foi produzido após cultivo dos fungos selecionados em meio Adamek (glicose 40 g.L<sup>-1</sup>, extrato de levedura 40 g.L<sup>-1</sup>, milhocina 30 g.L<sup>-1</sup>, água destilada qsp 1000 mL). O pré-inóculo contendo  $1 \times 10^7$  esporos foi cultivado em 25 mL de meio Adamek, e incubado em estufa shaker a 27°C com agitação de 110 rpm por 4 dias. Então, uma alíquota de 2 mL foi transferida para um frasco contendo 250 mL de meio Adamek, e o cultivo foi realizado em estufa shaker nas mesmas condições de temperatura e agitação por 7 dias. Após este período, o fermentado foi filtrado em papel filtro 0,45 µm e centrifugado por 10 minutos a 2500 x g para retirada do micélio, e então liofilizado em freeze dryer Modulyo (Edwards, Inglaterra). A massa resultante foi pesada para determinação do rendimento da fermentação, e depois novamente ressuspensa em água destilada para então passar por diálise por 48 horas a 4°C em uma membrana porosa com cut-off de 6-8 kDa, para fracionamento em macro e micromoléculas. As micromoléculas (E), presentes no eluído, e as macromoléculas (R), que permanecem no retido, foram novamente liofilizadas.

### 2.3 Dosagem de proteína total (adaptado de BRADFORD, 1976)

A concentração de proteínas das frações foi determinada pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina (BSA) para cálculo da curva padrão. Em

uma microplaca de 96 poços de fundo chato, foram aplicadas cinco concentrações de BSA, além das amostras em 3 concentrações distintas. As aplicações foram de 20 µL cada e feitas em triplicata, sendo água destilada usada como branco. Então foram adicionados 180 µL do reagente de Bradford (Bio-Rad, EUA) em cada poço, e a placa incubada a temperatura ambiente no escuro por 20 minutos. A leitura foi feita em leitor de placas ELx800 (Meridian Diagnostics, EUA) em comprimento de onda de 595 nm.

## **2.4 Dosagem de açúcares totais (adaptado de DUBOIS *et al.*, 1956)**

A dosagem de carboidratos foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, e a curva padrão feita com glicose. Em um tubo foram adicionados 20 µL da amostra, e então 20 µL de solução de fenol 80%. O tubo foi agitado, então 95 µL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados, e a reação incubada a 25°C por 10 minutos. As amostras, em três concentrações distintas, foram transferidas para uma microplaca de 96 poços de fundo chato, além de glicose em cinco concentrações para cálculo da curva padrão. As aplicações foram de 200 µL cada e feitas em triplicata, sendo água destilada usada como branco. A leitura foi feita em leitor de placas ELx800 (Meridian Diagnostics, Ohio, USA) em comprimento de onda de 490 nm.

## **2.5 Criação de *D. fovealis***

As lagartas de *D. fovealis* são mantidas em gaiolas sob condições controladas (25 ± 2°C, umidade relativa (U.R.) de 60 ± 10%, fotofase de 14 horas) e mantidas em dieta artificial (ZAWADNEAK *et al.*, 2017).

## **2.6 Avaliação da atividade inseticida das frações contendo micromoléculas (E) e macromoléculas (R) (adaptado de POITEVIN *et al.*, 2018)**

Para a avaliação das frações, em uma caixa plástica gerbox foi colocada uma folha de morango com o pecíolo mergulhado em água de forma a permitir a hidratação dos folíolos. Então, dez lagartas de 3º instar foram adicionadas com o auxílio de um pincel de ponta fina. Uma alíquota de 1 mL das frações, com

concentração de 15 mg de liofilizado.mL<sup>-1</sup> foi pulverizada sobre as lagartas com um aerógrafo Sagyma com pressão de 10 PSI. Dois controles foram realizados, um foi pulverizado com a respectiva fração do meio Adamek e outro com água destilada, e as caixas foram incubadas em estufa BOD a 25 ± 2°C, U.R. de 60 ± 10%, fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. As avaliações de mortalidade foram realizadas utilizando como critérios a resposta da lagarta ao toque, coloração e textura do tegumento.

## **2.7 Avaliação da atividade ovicida das frações (E) e (R)**

Pedaços de papel contendo dez ovos de 24 horas de *D. fovealis* foram mergulhados em 5 mL das diferentes frações na concentração de 15 mg de liofilizado.mL<sup>-1</sup>. Os papéis foram secos a temperatura ambiente, e então colocados em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo papel filtro umedecido. Dois controles foram realizados, um mergulhado na respectiva fração do meio Adamek e outro em água destilada. Todas as placas foram incubadas em estufa BOD a 25 ± 2°C, U.R. de 60 ± 10%, fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias. A avaliação de atividade ovicida levou em consideração os ovos não eclodidos, visualizados em estereomicroscópio Stemi 305 (Zeiss, Alemanha).

## **2.8 Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições. A mortalidade foi corrigida em relação à mortalidade do controle feito com água destilada (ABBOTT, 1925), seguido do teste de normalidade. A análise de variância foi realizada ao nível de 5% de probabilidade por modelos lineares generalizados e o teste de Tukey empregado para avaliação das médias. Os resultados foram analisados com o software Minitab 18 (Minitab Inc.).

## **2.9 Ressonância magnética nuclear (RMN)**

As frações que apresentaram atividade inseticida ou ovicida foram avaliadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN-<sup>13</sup>C). As amostras foram diluídas em água deuterada (D<sub>2</sub>O) 99% na concentração de 200 mg.mL<sup>-1</sup> e adicionadas a tubos

de 5 mm de diâmetro. Os espectros foram obtidos em espectrômetro DRX 400, série Avance (Bruker, EUA), à temperatura de 70°C. Foi utilizada a frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 s, sendo feitas entre 4000 – 70000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 s entre os pulsos. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm, utilizando acetona como padrão interno (30,2 ppm). Os espectros gerados foram analisados no software Top Spin 4.0.6 (Bruker).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Produção do fermentado

Os rendimentos da fermentação variaram entre 45,85 a 49,80 mg de liofilizado por mL de fermentado, enquanto para o controle obteve-se 56,47 mg de liofilizado por mL de meio Adamek (TABELA 1).

TABELA 1 – RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO (EM mg DE LIOFILIZADO POR mL DE FERMENTADO) APÓS CULTIVO EM MEIO ADAMEK POR 7 DIAS A 27°C E AGITAÇÃO DE 110 rpm

<b>Linhagem</b>	<b>Rendimento da fermentação (mg de liofilizado.mL<sup>-1</sup> de fermentado)</b>
PAE 69	48,98
Isa340	47,29
315	49,80
Bea1	46,50
Bea3	46,25
Bea111	45,85
Bea110	47,84
B2	47,99
B3	46,52
Adamek	56,47

Fonte: O autor (2017)

Após a diálise e separação das frações contendo macromoléculas (R) e micromoléculas (E), verificou-se que apenas 10% do fermentado é composto por

moléculas de peso molecular superior a 6 – 8 kDa. Todas as frações apresentaram alta concentração de açúcares totais e concentração variável de proteína (TABELA 2).

TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E AÇÚCARES TOTAIS NAS FRAÇÕES RETIDAS E ELUÍDAS APÓS DIÁLISE EM MEMBRANA DE 6 – 8 kDa

Fração	Linhagem	Concentração proteínas	Concentração açúcares
		totais (µg/mg de fermentado)	totais (µg/mg de fermentado)
Retido (R)	315	14,9	330,9
	Bea1	12,5	214,8
	Bea110	nd*	254,0
	Bea111	1,7	290,4
	Bea3	17,5	195,8
	B2	0,7	109,7
	B3	nd	176,4
	Isa340	2,8	173,7
	PAE 69	1,9	176,3
	Adamek	nd	399,8
Eluído (E)	315	10,9	394,1
	Bea1	22,0	77,0
	Bea110	14,6	178,8
	Bea111	8,2	173,5
	Bea3	22,5	108,0
	B2	18,5	392,4
	B3	19,6	239,8
	Isa340	11,4	570,3
	PAE 69	14,3	152,0
	Adamek	12,4	392,0

Nota: \*Concentração não detectável

Fonte: o autor (2018)

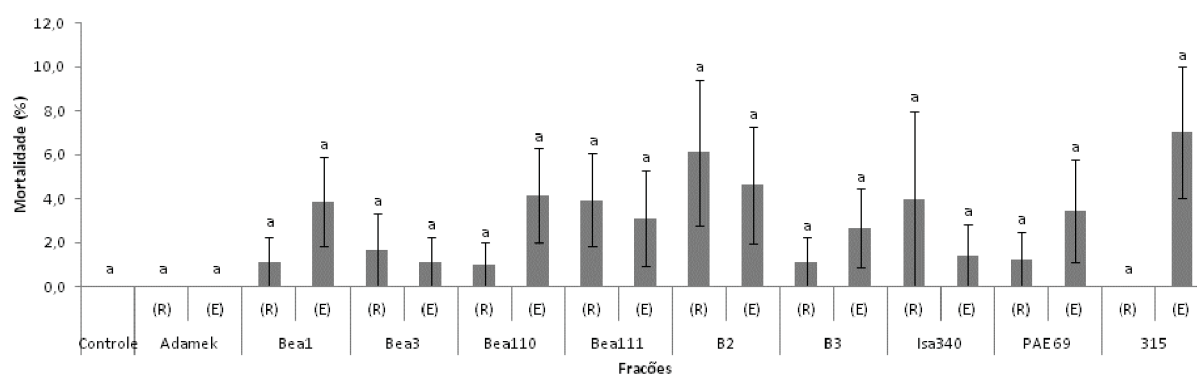
### 3.2 Avaliação da atividade inseticida das frações (E) e (R)

As frações não apresentaram efeito significativo sobre a mortalidade das lagartas de 3º ínstar de *D. fovealis* ( $F = 1,10$ , g.l. = 20,209,  $p = 0,353$ ). A maior



porcentagem foi de 7%, obtida com a fração (E) da linhagem 315 (*M. anisopliae*) (FIGURA 1). Apesar disso, as lagartas pulverizadas com as amostras ficaram letárgicas, diferentemente das lagartas do controle com água ou com meio Adamek.

FIGURA 1 – MORTALIDADE (MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO) DE LAGARTAS DE TERCEIRO ÍNSTAR DE *Duponchelia fovealis* PULVERIZADAS COM FRAÇÕES DE FERMENTADOS FÚNGICOS DE CONCENTRAÇÃO 15 mg DE LIOFILIZADO.mL<sup>-1</sup>, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25  $\pm$  2°C, U.R. DE 60  $\pm$  10% E FOTOPERÍODO DE 12 HORAS

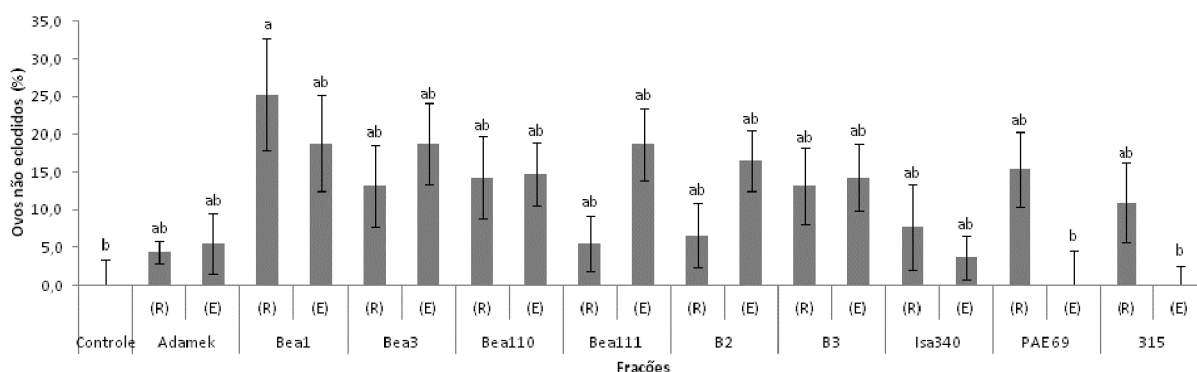


Fonte: O autor (2018)

Nota: Análise estatística pelo teste de Tukey ( $p = 0,353$ ). Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Houve efeito das frações quando avaliada a atividade ovicida ( $F = 2,00$ , g.l. = 20,209,  $p = 0,009$ ). A fração (R) da linhagem Bea1 apresentou melhor resultado, impedindo a eclosão de 25,3% dos ovos de *D. fovealis* (FIGURA 2).

FIGURA 2 – VIABILIDADE DE OVOS (MÉDIA  $\pm$  ERRO PADRÃO) DE *Duponchelia fovealis* MERGULHADOS EM FRAÇÕES DE FERMENTADOS FÚNGICOS DE CONCENTRAÇÃO 15 mg DE LIOFILIZADO.mL<sup>-1</sup>, APÓS 7 DIAS DE INCUBAÇÃO A 25  $\pm$  2°C, U.R. DE 60  $\pm$  10% E FOTOPERÍODO DE 12 HORAS



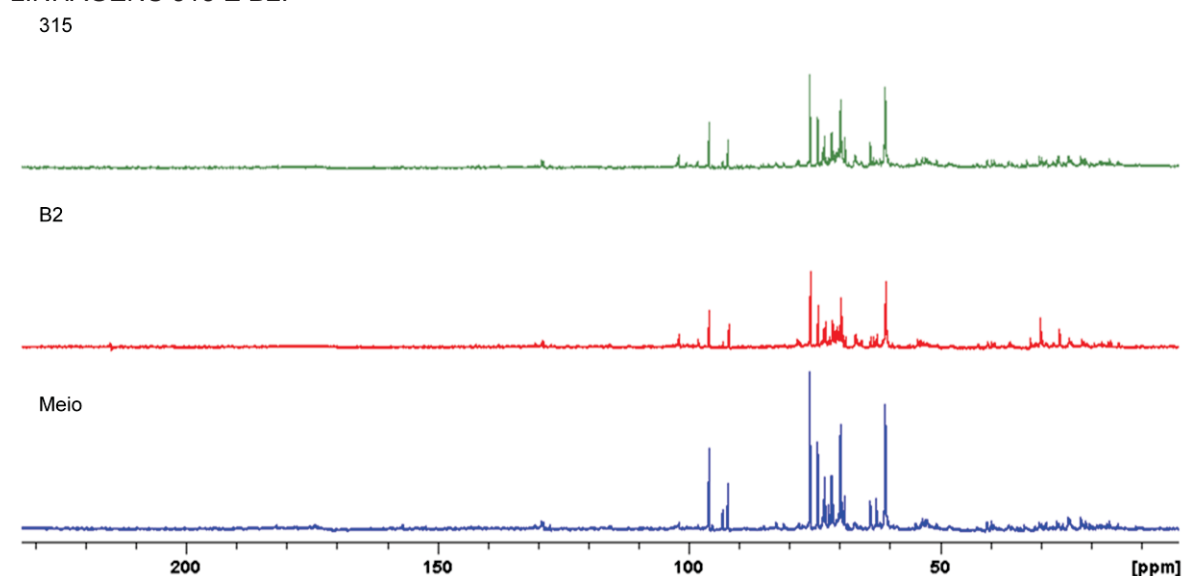
Fonte: O autor (2018)

Nota: Análise estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,01$ ). Barras seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

### 3.3 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN- $^{13}\text{C}$  entre as amostras da fração (R) das linhagens 315 e B2 apresentaram similaridade de sinais em relação ao meio (FIGURA 3). Os espectros têm sinais característicos de carboidratos (110 – 60 ppm), mas poucos picos característicos de proteínas (10 a 55, 130, 170 a 180 ppm).

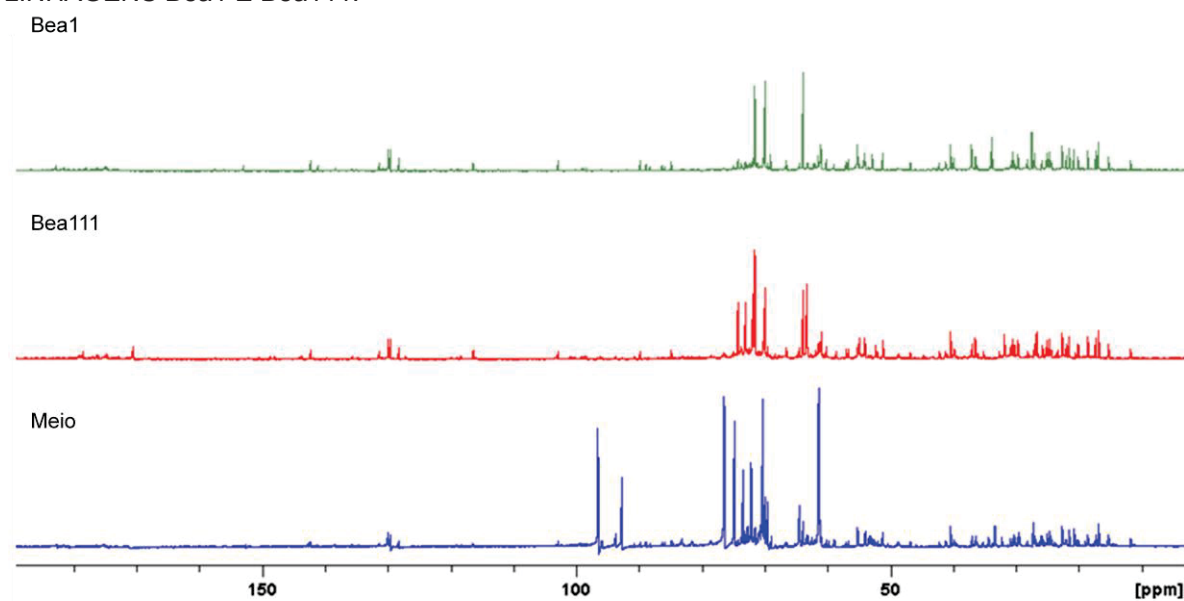
FIGURA 3 – ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES RETIDAS (R) DO MEIO ADAMEK E DAS LINHAGENS 315 E B2.



Fonte: O autor (2018)

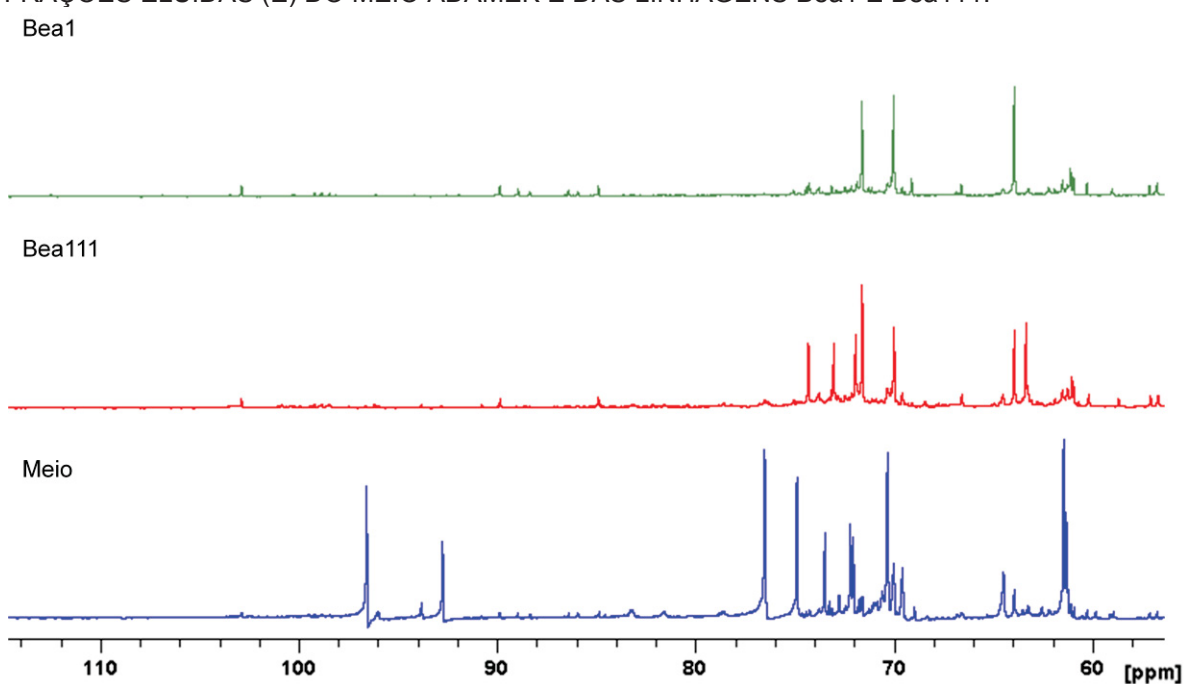
Já os espectros das frações (E) das linhagens Bea1 e Bea111 apresentaram algumas diferenças em relação ao meio (FIGURA 4). Os picos de  $\alpha$ -glicose (92,76 ppm) e  $\beta$ -glicose (96,6 ppm) desaparecem nos cultivos com fungos, além de alterar o perfil de outros carboidratos (FIGURA 5). O perfil de proteínas não sofreu alterações significativas entre as amostras.

FIGURA 4 – ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES ELUÍDAS (E) DO MEIO ADAMEK E DAS LINHAGENS Bea1 E Bea111.



Fonte: O autor (2018)

FIGURA 5 – ESPECTROS DE RMN- $^{13}\text{C}$  DA REGIÃO CARACTERÍSTICA DE CARBOIDRATOS DAS FRAÇÕES ELUÍDAS (E) DO MEIO ADAMEK E DAS LINHAGENS Bea1 E Bea111.



Fonte: O autor (2018)

## 4 DISCUSSÃO

Fermentados sem células de fungos filamentosos são amplamente estudados contra insetos (DANIEL *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2013; ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2009; ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2010b; QUESADA-MORAGA; CARRASCO-DÍAZ;

SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006; WAYAL *et al.*, 2018), entretanto não há nenhuma informação a respeito de metabólitos fúngicos no controle de *D. fovealis*.

O rendimento da fermentação em mg de liofilizado por mL de meio Adamek para o controle foi de 11 a 19% maior que para os fermentados. Em sete dias de cultivo, a cultura está na fase exponencial, estágio de maior atividade metabólica. É nesta fase em que ocorre o maior consumo de substrato tanto para produção de metabólitos quanto para multiplicação celular, justificando o menor rendimento em relação ao controle (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017). O meio Adamek é rico em carboidratos (QUESADA-MORAGA; CARRASCO-DÍAZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006), que foram hidrolisados pelos fungos durante o cultivo, como confirmado pelos espectros de RMN.

Embora os fungos testados tenham sido eficazes em controlar *D. fovealis* (AMATUZZI *et al.*, 2018; POITEVIN *et al.*, 2018), a mortalidade de ovos e lagartas após a pulverização das frações foi baixa. Uma etapa importante é a otimização das condições de cultivo, já que diferentes meios produzem diferentes perfis de metabólitos, o que está diretamente ligado à atividade inseticida. Quando avaliado contra *C. capitata*, fermentados de *M. anisopliae* utilizando peptona como fonte de nitrogênio apresentaram maior atividade inseticida do que os cultivos com extrato de levedura (ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2010a). Em comparação com outros meios, as moléculas produzidas em meio Adamek foram as que causaram menor mortalidade contra *G. mellonella* (ORTIZ-URQUIZA; KEYHANI; QUESADA-MORAGA, 2013), porém maior mortalidade contra *M. persicae* (KIM *et al.*, 2013).

Entre as substâncias produzidas pelos fungos entomopatogênicos estão policetídeos, como oosporeína e tenelina (MC NAMARA *et al.*, 2019), peptídeos não-sintetizados no ribossomo, como beauvericina, bassianolida e destruxina (GIBSON *et al.*, 2014; ZIMMERMANN, 2007a; ZIMMERMANN, 2007b), ácidos orgânicos envolvidos na virulência, como o ácido oxálico (MC NAMARA *et al.*, 2019), e enzimas atuantes no processo de penetração, como proteases, quitinases e lipases. A produção destas enzimas, em especial a quitinase, pode ser induzida pela adição de quitina coloidal no meio de cultura, favorecendo a colonização do inseto pelo fungo (KIM *et al.*, 2013).

Outro fator que pode ter interferido na mortalidade dos insetos é o método de aplicação dos filtrados. Fermentados tiveram ação tóxica via oral contra *S. littoralis* (QUESADA-MORAGA; CARRASCO-DÍAZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006) e *C.*

*capitata* (ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2010a); em *G. mellonella*, as frações foram injetadas nos segmentos abdominais (ORTIZ-URQUIZA *et al.*, 2010b).

Deve-se considerar também que, apesar das frações não apresentarem alta mortalidade, podem estar causando danos secundários na fisiologia do inseto. Moléculas com atividade anti-alimentar irão diminuir a população da praga em tempo mais longo (QUESADA-MORAGA; CARRASCO-DÍAZ; SANTIAGO-ÁLVAREZ, 2006); lesões no sistema reprodutivo podem causar a esterilidade e posterior redução das gerações seguintes da população praga (ALVES, 1998). Sendo assim, a avaliação dos efeitos subletais é importante para verificar alterações de parâmetros biológicos, como longevidade e capacidade reprodutiva (NOZAD-BONAB *et al.*, 2017). Além disso, filtrados de fungos entomopatogênicos são capazes de modular o sistema imune de insetos, alterando a produção de inibidores de protease, enzimas e proteínas antimicrobianas (MC NAMARA *et al.*, 2018). Isso significa que, embora não esteja causando a morte do inseto, os filtrados podem facilitar a proliferação de um patógeno oportunista, indicando a possibilidade do uso combinado filtrado-entomopatógeno (RESQUÍN-ROMERO; GARRIDO-JURADO; QUESADA-MORAGA, 2016).

Portanto, conclui-se que outros testes são necessários, como a avaliação da biologia do inseto após pulverização, que pode determinar os danos secundários produzidos por estes fermentados, ou a pulverização mista com fungos entomopatogênicos. Além disso, a produção de metabólitos secundários inseticidas deve ser otimizada com a avaliação de outros meios e condições de cultivo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba (SP): Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

AMATUZZI, R.F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; DALZOTO, P.; ZAWADNEAK, M.A.; PIMENTEL, I.C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.78, n.3, p.429-435, 2018a.

AMATUZZI, R.F.; POITEVIN, C.G.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.;

PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, v.9, n.2, p.70, 2018b.

ANTUNES, L.E.C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J.E. **Morangueiro**. Brasília (DF): Embrapa, 2016.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annual Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. **The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida**. 2010. Disponível em <<http://www.freshfromflorida.com/content/download/23893/486212/duponchelia-fovealis.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

DANIEL, J.F.D.S.; SCALCO, A.V.; DE SOUZA, R.M.; OCAMPOS, F.M.M.; BARISON, A.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* to *Beauveria bassiana* extracts. **Natural Product Research**, p.1-4, 2018.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

GIBSON, D.M.; DONZELLI, B.G.; KRASNOFF, S.B.; KEYHANI, N. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports**, v.31, n.10, p.1287-1305, 2014.

KIM, J.J.; JEONG, G.; HAN, J.H.; LEE, S. Biological control of aphid using fungal culture and culture filtrates of *Beauveria bassiana*. **Mycobiology**, v.41, n.4, p.221-224, 2013.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2019. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> (acesso em fevereiro de 2019).

MC NAMARA, L.; DOLAN, S.K.; WALSH, M.D.; STEPHENS, J.C.; GLARE, T.R.; KAVANAGH, K.; GRIFFIN, C.T. Oosporein, an abundant metabolite in *Beauveria caledonica*, with a feedback induction mechanism and a role in insect virulence. **Fungal Biology**, in press, 2019.

MC NAMARA, L.; GRIFFIN, C.T.; FITZPATRICK, D.; KAVANAGH, K.; CAROLAN, J.C. The effect of entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response and haemolymph proteome of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.101, p.1-13, 2018.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M.J. Insect pathogenic fungi as endophytes. **Advances in Genetics**, v.94, p.107-135, 2016.

NOZAD-BONAB, Z.; HEJAZI, M.J.; IRANIPOUR, S.; ARZANLOU, M. Lethal and sublethal effects of some chemical and biological insecticides on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) eggs and neonates. **Journal of Economic Entomology**, 2017.

ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; BORREGO, A.; QUESADA-MORAGA, E. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). **Pest Management Science**, v.66, n.7, p.725-735, 2010a.

ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; QUESADA-MORAGA, E. Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Pest Management Science**, v.65, n.10, p.1130-1139, 2009.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O.; QUESADA-MORAGA, E. Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.23, n.10, p.1199-1212, 2013.

ORTIZ-URQUIZA, A.; RIVEIRO-MIRANDA, L.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; QUESADA-MORAGA, E. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.105, n.3, p.270-278, 2010b.

PAES, J.P.P.; LIMA, V.L.S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J.R.; BUENO, R.C.O.F. Selection of parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and parasitism at different eggs ages of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.40, p.e42216, 2018.

PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, D.C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **BioControl**, v.55, p.187-198, 2010.

PIROVANI, V.D.; PRATISSOLI, D.; TIBÚRCIO, M.O. CARVALHO, J.R.D.; DAMASCENA, A.P.; FARIA, L.V. *Trichogramma galloi* and *Trichogramma pretiosum* for the management of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in strawberry plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.8, p.690-693, 2017.

POITEVIN, C.G.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.53, n.3, p.323-331, 2018.

QUESADA-MORAGA, E.; CARRASCO-DÍAZ, J.A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v.130, n.8, p.442-452, 2006.



RESQUÍN-ROMERO, G.; GARRIDO-JURADO, I.; QUESADA-MORAGA, E. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.92, p.101-110, 2016.

RODRIGUES, R.; JARAS, L.I.; POLTRONIERI, A.S.; PIMENTEL, I.C.; ZAWADNEAK, M.A.C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **EntomoBrasilis**, v.10, n.1, p.26-32, 2017.

STENBERG, J.A. A conceptual framework for integrated pest management. **Trends in Plant Science**, v.22, n.9, p.759-769, 2017.

STOCKS, S.D.; HODGES, A. **European pepper moth or Southern European marsh pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. 2012. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN91000.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia**. Porto Alegre (RS): Artmed Editora, 2016.

WAYAL, N.D.; MEHENDALE, S.K.; GOLVANKAR, G.M.; DESAI, V.S.; NAIK, K.V. Bioefficacy of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin culture filtrates from different liquid media against *Aphis craccivora* (Koach) under laboratory condition. **International Journal of Chemical Studies**, v.6, n.6, p.1935-1939, 2018.

WENG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, W.; HU, Q. Secondary metabolites and the risks of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Molecules**, v.24, n.4, p.664, 2019.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; PIMENTEL, I.C.; SCHUBER, J.M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A.S.; ALMA SOLIS, M. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, n.3, p.91-95, 2016.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; POLTRONIERI, A.S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A.M. BORBA, A.M.; PIMENTEL, I.C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v.114, p.291-294, 2017.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.6, p.553-596, 2007.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.9, p.879-920, 2007.

## CONCLUSÃO

Com o presente trabalho foi possível avaliar o potencial de diferentes espécies de fungos entomopatogênicos contra a lagarta-da-coroa, *Duponchelia fovealis*. Entre os fungos testados, dois se destacaram por apresentarem as maiores taxas de mortalidade, as linhagens Bea111 (*Beauveria bassiana*) e Isa340 (*Cordyceps javanica*).

A otimização nutricional e física para cultivo destas linhagens por fermentação em estado sólido atingiu maior produção de esporos em casca de soja de tamanho de partícula e leito menores, em cultivo nas condições do ponto central. Para a fermentação submersa, a maior produção ocorreu em caldo V8, também cultivado nas condições do ponto central para *C. javanica*. Já *B. bassiana* necessita de velocidade de agitação maior. O método de produção de esporos não interferiu significativamente na produção, tamanho e eficácia dos esporos em bioensaio contra *D. fovealis*, sendo as duas metodologias viáveis e de custo igual ou inferior ao comumente utilizado.

Os fermentados obtidos a partir do cultivo dos fungos em meio Adamek diminuíram a viabilidade dos ovos, e não causaram mortalidade significativa em lagartas de terceiro ínstar de *D. fovealis*. Todavia, as lagartas ficaram mais lentas, indicando possíveis danos secundários. Novos testes devem ser realizados para a determinação do efeito dos fermentados na biologia do inseto.

Portanto, conclui-se que novos inseticidas biológicos podem ser desenvolvidos utilizando estes microrganismos como agente de ação. Para tanto, perspectivas futuras incluem a avaliação do efeito citotóxico destes microrganismos, o desenvolvimento de uma formulação, e a avaliação da atividade destes em campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v.18, p.265-267, 1925.

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba (SP): Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1998.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos e Alimentos**. 2016. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>> (acesso em fevereiro de 2019).

AMATUZZI, R.F. **Prospecção de fungos entomopatogênicos de solos agrícolas e mata nativa para o controle de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) em morangueiro**. 115 f. Tese (Doutorado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

AMATUZZI, R.F.; CARDOSO, N.; POLTRONIERI, A.S.; POITEVIN, C.G.; DALZOTO, P.; ZAWADNEAK, M.A.; PIMENTEL, I.C. Potential of endophytic fungi as biocontrol agents of *Duponchelia fovealis* (Zeller) (Lepidoptera: Crambidae). **Brazilian Journal of Biology**, v.78, n.3, p.429-435, 2018.

AMATUZZI, R.F.; POITEVIN, C.G.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Susceptibility of *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae) to Soil-Borne Entomopathogenic Fungi. **Insects**, v.9, n.2, p.70, 2018.

ANTUNES, L.E.C.; REISSER JUNIOR, C.; SCHWENGBER, J.E. **Morangueiro**. Brasília (DF): Embrapa, 2016.

ASI, M.R.; BASHIR, M.H.; AFZAL, M.; ZIA, K.; AKRAM, M. Potential of entomopathogenic fungi for biocontrol of *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Animal and Plant Sciences**, v.23, n.3, p.913-918, 2013.

BONSIGNORE, C.P.; VACANTE, V. *Duponchelia fovealis* (Zeller). Une nuova emergenza per la fragola. **Protezione delle colture**, v.3, p.40-43, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annual Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAMBILA, J.; STOCKS, I. **The European pepper moth, *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae), a Mediterranean pest moth discovered in central Florida**. 2010. Disponível em <<http://www.freshfromflorida.com/content/download/23893/486212/duponchelia-fovealis.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

CABI. **Centre for Agriculture and Bioscience International**. 2019. Disponível em <<https://www.cabi.org/isc/datasheet/20168>> (acesso em fevereiro de 2019).

CASSALES, A.; DE SOUZA-CRUZ, P.B.; RECH, R.; AYUB, M.A.Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v.35, n.11, p.4675-4683, 2011.

CITO, A.; BARZANTI, G.P.; STRANGI, A.; FRANCARDI, V.; ZANFINI, A.; DREASSI, E. Cuticle-degrading proteases and toxins as virulence markers of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Journal of Basic Microbiology**, v.56, n.9, p.941-948, 2016.

DANIEL, J.F.D.S.; SCALCO, A.V.; DE SOUZA, R.M.; OCAMPOS, F.M.M.; BARISON, A.; ALVES, L.F.A.; NEVES, P.M.O.J. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* to *Beauveria bassiana* extracts. **Natural Product Research**, p.1-4, 2018.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.

EFIL, L.; ÖZGÜR, O.; EFIL, F. A new pest, *Duponchelia fovealis* Zeller, on strawberries in Turkey: damage, distribution and parasitoid. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.2, n.4, p.328-334, 2014.

EILENBERG, J.; HAJEK, A.; LOMER, C. Suggestions for unifying the terminology in biological control. **BioControl**, v.46, p.387-400, 2001.

EMBRAPA. **Embrapa Soja**. 2019. Disponível em <<https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos>> (acesso em fevereiro de 2019).

FACHINELLO, J.C.; PASA, M.D.S.; SCHMITZ, J.D.; BETEMPS, D.L. Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.33, n.1, p.109-120, 2011.

FAO. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2019. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#search/Strawberries>> (acesso em fevereiro de 2019).

FENG, K.C.; LIU, B.L.; TZENG, Y.M. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentation. **Bioprocess Engineering**, v.23, p.25-29, 2000.

FRANCO, M.C.; BAPTISTA, M.C. *Duponchelia fovealis* Zeller – nova peste em Portugal. **Frutas, Legumes e Flores**, v.110, p.34-35, 2010.

GIBSON, D.M.; DONZELLI, B.G.; KRASNOFF, S.B.; KEYHANI, N. Discovering the secondary metabolite potential encoded within entomopathogenic fungi. **Natural Product Reports**, v.31, n.10, p.1287-1305, 2014.

GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M.M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORIFEIN, E.; MESSELINK, G.J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v.89, n.2, p.295-311, 2016.

HAJEK, A.E.; DELALIBERA JR, I. Fungal pathogens as classical biological control agents against arthropods. **BioControl**, v.55, p.147-158, 2010.

HEGEDUS, D.D.; BIDOCHKA, M.J.; MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.6, p.785-789, 1992.

HOLLAND, R. J.; GUNASEKERA, T.S.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, K.M. Ultrastructure and properties of *Paecilomyces lilacinus* spores. **Canadian Journal of Microbiology**, v.48, n.10, p.879-885, 2002.

HOUBRAKEN, M.; BAUWERAERTS, I.; FEVERY, D.; LABEKE, M.C.V.; SPANOGHE, P. Pesticide knowledge and practice among horticultural workers in the Lam Dong region, Vietnam: a case study of chrysanthemum and strawberries. **Science of the Total Environment**, v.550, p.1001-1009, 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ITO, F.A.D.; PIMENTEL, I.C.; POITEVIN, C.G. Niger seed agar induces sporulation of filamentous fungi with potential in biological control of agricultural diseases and pests. **International Journal of Microbiology Research**, 2019.

JACKSON, M.A. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.180-187, 1997.

JARONSKI, S.T. **Mass production of entomopathogenic fungi: state of the art**. In: MORALES-RAMOS, J.A.; ROJAS, M.G.; SHAPIRO-ILAN, D.I. Mass production of beneficial organisms, p. 357-413, 2014.

JEFFS, L.B.; XAVIER, I.J.; MATAI, R.E.; KHACHATOURIANS, G.G. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the general *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium*, and *Verticillium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.45, n.11, p.936-948, 1999.

KIM, J.J.; JEONG, G.; HAN, J.H.; LEE, S. Biological control of aphid using fungal culture and culture filtrates of *Beauveria bassiana*. **Mycobiology**, v.41, n.4, p.221-224, 2013.

KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. **Bioresource Technology**, v.102, p.3169-3175, 2011.

LEES, E.; BARTON, R.C. The use of Niger seed agar to screen for *Candida dubliniensis* in the clinical microbiology laboratory. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, n.1, p.13-17, 2003.

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. 2019. Disponível em <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)> (acesso em fevereiro de 2019).

MARTINS, D.S.; STRASSBURGER, A.S.; PEIL, R.M.N.; SCHWENGBER, J.E.; REISSER JUNIOR, C.; FURTADO, L.G. Fisiologia da produção do morangueiro. In: **Morangueiro irrigado: aspectos técnicos e ambientais do cultivo**. Edição: TIMM, L.C.; TAVARES, V.E.Q.; REISSER JUNIOR, C.; ESTRELA, C.C. Pelotas (RS): Embrapa Clima Temperado, 2009.

MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; KOBORI, N.N.; BEHLE, R.W.; DELALIBERA JR, I. Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.127, p.11-20, 2015.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; QUINTELA, E.D.; DELALIBERA JR, I. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation. **Biological Control**, v.66, p.209-218, 2013.

MASCARIN, G.M.; KOBORI, N.N.; VITAL, R.C.J.; JACKSON, M.A.; QUINTELA, E.D. Production of microsclerotia by Brazilian strains of *Metarhizium* spp. using submerged liquid culture fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.1583-1590, 2014.

MATYJASZCYK, E. Products containing microorganisms as a tool in integrated pest management and the rules of their market placement in the European Union. **Pest Management Science**, v.71, n.9, p.1201-1206, 2015.

MC NAMARA, L.; DOLAN, S.K.; WALSH, M.D.; STEPHENS, J.C.; GLARE, T.R.; KAVANAGH, K.; GRIFFIN, C.T. Oosporein, an abundant metabolite in *Beauveria caledonica*, with a feedback induction mechanism and a role in insect virulence. **Fungal Biology**, in press, 2019.

MC NAMARA, L.; GRIFFIN, C.T.; FITZPATRICK, D.; KAVANAGH, K.; CAROLAN, J.C. The effect of entomopathogenic fungal culture filtrate on the immune response and haemolymph proteome of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.101, p.1-13, 2018.

MOONJELY, S.; BARELLI, L.; BIDOCHKA, M.J. Insect pathogenic fungi as endophytes. **Advances in Genetics**, v.94, p.107-135, 2016.

MORALES-REYES, C.; MASCARIN, G.M.; JACKSON, M.A.; HALL, D.; SÁNCHEZ-PEÑA, S.R.; ARTHURS, S.P. Comparison of aerial conidia and blastospores from two entomopathogenic fungi against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) under



laboratory and greenhouse conditions. **Biocontrol Science and Technology**, p.1-13, 2018.

MUÑIZ-PAREDES, F.; GARZA-LÓPEZ, P.M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; LOERA, O. Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.32, n.7, p.111, 2016.

NOZAD-BONAB, Z.; HEJAZI, M.J.; IRANIPOUR, S.; ARZANLOU, M. Lethal and sublethal effects of some chemical and biological insecticides on *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) eggs and neonates. **Journal of Economic Entomology**, 2017.

ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; BORREGO, A.; QUESADA-MORAGA, E. Effects of cultural conditions on fungal biomass, blastospore yields and toxicity of fungal secreted proteins in batch cultures of *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales). **Pest Management Science**, v.66, n.7, p.725-735, 2010.

ORTIZ-URQUIZA, A.; GARRIDO-JURADO, I.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; QUESADA-MORAGA, E. Purification and characterisation of proteins secreted by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* with insecticidal activity against adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Pest Management Science**, v.65, n.10, p.1130-1139, 2009.

ORTIZ-URQUIZA, A.; KEYHANI, N. O.; QUESADA-MORAGA, E. Culture conditions affect virulence and production of insect toxic proteins in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.23, n.10, p.1199-1212, 2013.

ORTIZ-URQUIZA, A.; RIVEIRO-MIRANDA, L.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; QUESADA-MORAGA, E. Insect-toxic secreted proteins and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.105, n.3, p.270-278, 2010.

OSHITA, D.; JARDIM, I.C.S.F. Morango: uma preocupação alimentar, ambiental e sanitária, monitorado por cromatografia líquida moderna. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.1, p.52-76, 2012.

PAES, J.P.P.; LIMA, V.L.S.; PRATISSOLI, D.; CARVALHO, J.R.; BUENO, R.C.O.F. Selection of parasitoids of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and parasitism at different eggs ages of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.40, p.e42216, 2018.

PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo (SP): Editora Manole, 2002.



- PEDRAS, M.S.C.; ZAHARIA, L.I.; WARD, D.E. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. **Phytochemistry**, v.59, n.6, p.579-596, 2002.
- PELL, J.K.; HANNAM, J.J.; STEINKRAUS, D.C. Conservation biological control using fungal entomopathogens. **BioControl**, v.55, p.187-198, 2010.
- PIROVANI, V.D.; PRATISSOLI, D.; TIBÚRCIO, M.O. CARVALHO, J.R.D.; DAMASCENA, A.P.; FARIA, L.V. *Trichogramma galloi* and *Trichogramma pretiosum* for the management of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in strawberry plants. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.52, n.8, p.690-693, 2017.
- POITEVIN, C.G.; PORSANI, M.V.; POLTRONIERI, A.S.; ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C. Fungi isolated from insects in strawberry crops act as potential biological control agents of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.53, n.3, p.323-331, 2018.
- PRAKASH, G.V.S.B.; PADMAJA, V.; KIRAN, R.R.S. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.99, p.1530-1537, 2008.
- QUESADA-MORAGA, E.; CARRASCO-DÍAZ, J.A.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Insecticidal and antifeedant activities of proteins secreted by entomopathogenic fungi against *Spodoptera littoralis* (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, v.130, n.8, p.442-452, 2006.
- QUESADA-MORAGA, E.; HERRERO, N.; ZABALGOGEAZCOA, I. Entomopathogenic and nematophagous fungal endophytes. In: **Advances in Endophytic Research**. Edição: VERMA, V.C.; GANGE, A.C. New Delhi: Springer India, 2014.
- QUESADA-MORAGA, E.; MARANHAO, E.A.A. VALVERDE-GARCIA, P.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Selection of *Beauveria bassiana* isolates for control of the whiteflies *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* on the basis of their virulence, thermal requirements, and toxicogenic activity. **Biological Control**, v.36, p.274-287, 2006.
- RESQUÍN-ROMERO, G.; GARRIDO-JURADO, I.; QUESADA-MORAGA, E. Combined use of entomopathogenic fungi and their extracts for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v.92, p.101-110, 2016.
- ROBL, D.; SUNG, L.B.; NOVAKOVICH, J.H.; MARANGONI, P.R.D.; ZAWADNEAK, M.A.C.; DALZOTO, P.R.; GABARDO, J.; PIMENTEL, I.C. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson strains on agro-industrial residues. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.296-300, 2009.
- ROBERTSON, J.L.; RUSSELL, R.M.; PREISLER, H.K.; SAVIN, N.E. **Bioassays with Arthropods**, 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007.

RODRIGUES, R.; JARAS, L.I.; POLTRONIERI, A.S.; PIMENTEL, I.C.; ZAWADNEAK, M.A.C. Seletividade de inseticidas reguladores de crescimento e botânico no parasitismo de três espécies de *Trichogramma* em ovos de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). **EntomoBrasilis**, v.10, n.1, p.26-32, 2017.

RODRIGUEZ-LEON, J.A.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A.; RODRÍGUEZ, D.E. **Factors affecting solid-state fermentation**. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Current developments in solid-state fermentation, p. 26-47, 2007.

SANTA, H.S.D.; SANTA, O.R.D.; BRAND, D.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.51-60, 2005.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v.56, p.1267–1274, 2010.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: **World Congress on Computers in Agriculture 7**. Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, J.N.; MASCARIN, G.M.; GOMES, I.C.S.; TINÔCO, R.S.; QUINTELA, E.D.; CASTILHO, L.R.; FREIRE, D.M.G. New cost-effective bioconversion process of palm kernel cake into bioinsecticides based on *Beauveria bassiana* and *Isaria javanica*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, n.6, p.2595-2606, 2018.

SILVA, V.C.A.; BARROS, R.; MARQUES, J.E.; TORRES, J.B. Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) to the fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. **Neotropical Entomology**, v.32, n.4, p.653-658, 2003.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.205-218, 2003.

STAIB, P.; MORSCHHÄUSER, J. Chlamydospore formation on Staib agar as a species-specific characteristic of *Candida dubliniensis*. **Mycoses**, v.42, n.9-10, p.521-524, 1999.

STENBERG, J.A. A conceptual framework for integrated pest management. **Trends in Plant Science**, v.22, n.9, p.759-769, 2017.

STOCKS, S.D.; HODGES, A. **European pepper moth or Southern European marsh pyralid *Duponchelia fovealis* (Zeller)**. 2012. Disponível em <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN91000.pdf>> (acesso em janeiro de 2015).

TORTORA, G.J.; CASE, C.L.; FUNKE, B.R. **Microbiologia**. Porto Alegre (RS): Artmed Editora, 2016.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.81, p.146-161, 2013.

VAN LENTEREN, J.C. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. **BioControl**, v.57, p. 1-20, 2012.

VAN LENTEREN, J.C.; BOLCKMANS, K.; KÖHL, J.; RAVENSBERG, W.J.; URBANEJA, A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. **BioControl**, v.63, n.1, p.39-59, 2017.

VEGA, F.E.; GOETTEL, M.S.; BLACKWELL, M.; CHANDLER, D.; JACKSON, M.A.; KELLER, S.; KOIKE, M.; MANIANIA, N.K.; RANGEL, D.E.N.; ROY, H.E. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **Fungal Ecology**, v.2, p.149-159, 2009.

VICCINI, G.; MANNICH, M.; CAPALBO, D.M.F.; SANHUEZA, R.V.; MITCHELL, D.A. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. **Process Biochemistry**, v.42, p.275-278, 2007.

WANG, C.; ST. LEGER, R.J. Genomics of entomopathogenic fungi. In: **The ecological genome of fungi**. Edição: MARTIN, F. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons Inc, 2013.

WANG, J.; LOVETT, B.; ST. LEGER, R.J. The secretome and chemistry of *Metarhizium*; a genus of entomopathogenic fungi. **Fungal Ecology**, v.38, p.7-11, 2019.

WAYAL, N.D.; MEHENDALE, S.K.; GOLVANKAR, G.M.; DESAI, V.S.; NAIK, K.V. Bioefficacy of *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin culture filtrates from different liquid media against *Aphis craccivora* (Koach) under laboratory condition. **International Journal of Chemical Studies**, v.6, n.6, p.1935-1939, 2018.

WENG, Q.; ZHANG, X.; CHEN, W.; HU, Q. Secondary metabolites and the risks of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. **Molecules**, v.24, n.4, p.664, 2019.

WRAIGHT, S.P.; RAMOS, M.E.; AVERY, P.B.; JARONSKI, S.T.; VANDENBERG, J.D. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.103, n.3, p.186-199, 2010.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; PIMENTEL, I.C.; SCHUBER, J.M.; SANTOS, B.; POLTRONIERI, A.S.; ALMA SOLIS, M. First record of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) in South America. **Idesia**, v.34, n.3, p.91-95, 2016.

ZAWADNEAK, M.A.C.; GONÇALVES, R.B.; POLTRONIERI, A.S.; SANTOS, B.; BISCHOFF, A.M. BORBA, A.M.; PIMENTEL, I.C. Biological parameters of *Duponchelia fovealis* (Lepidoptera: Crambidae) reared in the laboratory on two diets. **European Journal of Entomology**, v.114, p.291-294, 2017.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.6, p.553-596, 2007.

ZIMMERMANN, G. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. **Biocontrol Science and Technology**, v.18, n.9, p.865-901, 2008.

ZIMMERMANN, G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology**, v.17, n.9, p.879-920, 2007.